

**Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik I des
Klinikums der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Steffen Massberg**

Kumulative Habilitationsschrift

***Mechanismen der sterilen Inflammation bei
kardiovaskulären Erkrankungen***

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Innere Medizin

**vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**von
Dr. med. Konstantin Stark**

2019

Inhaltverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Wissenschaftliche Arbeiten	5
a. Der Einfluss von Perizyten auf die sterile Inflammation	5
b. Atheroprotektive Effekte des Chemokins CCL2 im Kompartiment der Gefäßwand	9
c. Eosinophile Granulozyten fördern die Bildung atherosklerotischer Plaques sowie die arterielle Thrombose durch die Bildung von extracellular traps	17
d. Das Zusammenspiel von Thrombozyten und myeloiden Leukozyten bei venöser Thrombose	25
e. HMGB1 als Mediator der sterilen Inflammation bei venöser Thrombose	29
f. Die thrombogenen Eigenschaften von Tumor Mikrovesikeln sind unabhängig vom Prozess der sterilen Inflammation in der venösen Thrombose	32
3. Zusammenfassung und Ausblick	33
4. Abkürzungsverzeichnis	36
5. Literaturverzeichnis	38
6. Verzeichnis der Arbeiten der Habilitationsleistung	45
7. Danksagung	46

1. Einleitung:

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache und in ihrer Pathophysiologie nach wie vor unzureichend verstanden. Trotz neuer Therapieoptionen sind Atherosklerose und die daraus resultierende Schädigung des Herzmuskelgewebes durch die Thrombose von Koronararterien chronisch fortschreitende Erkrankungen. In der Akutsituation führt die Ischämie des Myokards zu einer Nekrose, welche wiederum eine sterile Entzündungsreaktion auslöst. Letzteres ist gekennzeichnet durch eine Inflammation in Abwesenheit eines Pathogens und wird durch die Freisetzung intrazellulärer Mediatoren in den extrazellulären Raum verursacht. Trotz der Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes mittels PTCA wird dieser Prozess in Gang gesetzt und trägt durch eine überschießende Immunreaktion zur weiteren Myokardschädigung bei, ist jedoch auch von großer Bedeutung für die Heilungsreaktion des Infarktareals (Novotny et al., 2018). Die sterile Entzündungsreaktion ist die pathophysiologische Grundlage von Atherosklerose, Thrombose und Myokardinfarkt und ist daher ein vielversprechender neuer Ansatzpunkt in der Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen.

Durch die Zellnekrose werden sogenannte *damage associated molecular patterns* (DAMPs) freigesetzt. Hierbei handelt es sich um intrazelluläre Moleküle, die normalerweise nicht im extrazellulären Raum zu finden sind. Gelangen sie jedoch in den extrazellulären Raum, werden sie von Leukozyten des angeborenen Immunsystems erkannt und lösen eine sterile Entzündungsreaktion aus (Chen and Nunez, 2010). Der prototypische Vertreter der DAMPs ist das Protein HMGB1 (high mobility group box 1), welches an nukleäre DNA gebunden ist und die Konformation des Chromatins sowie die Genexpression reguliert (Venereau et al., 2013). Wird es im Rahmen der Nekrose aus einer Zelle freigesetzt, kommt es zur Detektion durch *pattern recognition receptors* (PRRs) wie *toll-like receptors* (TLRs) auf Immunzellen. Damit wird ein Prozess in Gang gesetzt, der in vielerlei Hinsicht der Abwehr von Pathogenen ähnelt, jedoch primär der Beseitigung nekrotischen Gewebes dient.

Hierbei kommt es zunächst zur Aktivierung der Blutgefäße, sowohl des Endothels als auch der umgebenden Zellen der Gefäßwand – insbesondere der Perizyten – was die nachfolgende Rekrutierung von Immunzellen zum Nekrosefokus maßgeblich steuert. Zunächst werden neutrophile Granulozyten aus dem Blutstrom angelockt (Lerchenberger et al., 2013; Zehrer et al., 2018). Diese migrieren aus aktivierten postkapillären Venolen in aufeinanderfolgenden Wellen zum Nekrosefokus, wo sie degranulieren und so eine weitere Schädigung des Gewebes verursachen. Zudem bilden sie *neutrophil extracellular traps* (NETs), die durch Freisetzung nukleärer DNA aus neutrophilen Granulozyten entstehen. An diese DNA-Strukturen sind Enzyme aus den Granula der neutrophilen Granulozyten angehaftet, wie etwa Myeloperoxidase oder neutrophile Elastase. NETs wurden primär durch ihre bakteriziden Eigenschaften identifiziert, tragen aber auch zur sterilen Entzündungsreaktion im Rahmen der Thrombose bei (Pfeiler et al., 2016). Sobald die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten abgeschlossen ist, kommt es zur

Migration von Monozyten und Makrophagen zum Entzündungsherd, wobei diesen Zellen eher eine protektive Rolle zugeschrieben wird, da sie abgestorbenes Gewebe phagozytieren und so die Heilung des Gewebes einleiten.

Interessanterweise laufen ähnliche Mechanismen bei der venösen Thrombose (TVT) ab, sodass auch dieser Prozess als eine aberrante sterile Entzündungsreaktion einzuordnen ist (Engelmann and Massberg, 2013). Die venöse Thrombose ist eine der häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen, der angesichts einer alternden Bevölkerung eine zunehmende klinische Relevanz zukommt (Heit, 2015). Durch Embolisation des entstandenen Thrombus aus einer peripheren Vene in die Lungenarterien ist diese Erkrankung zudem mit einem signifikanten Mortalitätsrisiko verbunden. Daher sind eine weitere Erforschung der Pathophysiologie der frühen Stadien der venösen Thrombose und die Weiterentwicklung der Therapieoptionen nicht nur von wissenschaftlichem Interesse, sondern auch von sozioökonomischer Bedeutung (Silverstein et al., 1998). Im Gegensatz zur arteriellen Thrombose, die meist infolge der Ruptur atherosklerotischer Plaques und Endothelverletzungen entstehen (Jackson, 2011), gelten die Faktoren der sogenannten Virchow-Trias als klassische Risikofaktoren für Venenthrombosen: Veränderungen der Gefäßwand, der Blutzusammensetzung oder des Blutflusses. Bei Langstreckenflügen oder längerer Immobilisation entstehen venöse Thromben durch Stase in den Klappentaschen der tiefen Unterschenkel- bzw. Muskelvenen (Hughes et al., 2003; Wright et al., 1951). Ein träger Blutfluss in diesen Venen reduziert die Sauerstoffversorgung der vaskulären Klappenspitzen, es kommt zum Verlust der antikoagulatorischen Eigenschaften des Endothels und zur Exposition von Adhäsionsmolekülen, welche die Ansammlung von Blutzellen ermöglichen (Sevitt, 1974). Bis dato wurden experimentelle Modelle der arteriellen Thrombose mit Endothelschädigungen auf das venöse System übertragen und zur Grundlagenforschung der TVT genutzt, was aber nur die Situation der Trauma-induzierten TVT durch direkte Gefäßschädigung angemessen abbildet. Es ist unserer Arbeitsgruppe gelungen ein klinisch relevantes, neuartiges Modell der TVT an der Maus zu entwickeln, welches detaillierte Untersuchungen der Entstehung der tiefen Venenthrombose ermöglicht. Ähnlich der bewegungsarmen Situation bei bettlägerigen Patienten oder bei Langstreckenflügen wird in diesem Modell in der Vena cava inferior eine starke Flussreduktion induziert. Der sich daraufhin entwickelnde Thrombus ähnelt in seinem Aufbau und seiner protrahierten Entstehung humanen Blutgerinnseln. Die Ereignisse während der Entstehung der venösen Thrombose konnten mittels intravitaler 2-Photonen Mikroskopie entschlüsselt werden. Durch diese innovative Bildgebungstechnik können zelluläre wie subzelluläre Prozesse *in vivo* mit dreidimensionaler Auflösung verfolgt werden, was eine detaillierte Analyse der Mechanismen der Thrombusinitiierung erlaubt. Damit ermöglicht dieses Modell die Entschlüsselung der zellulären und molekularen Prozesse, durch die eine Veränderung des Blutflusses über Aktivierung der Blutgerinnung zum thrombotischen Gefäßverschluss führt.

Ziel der dieser Habilitationsschrift zugrunde liegenden Arbeiten ist es, die Mechanismen der sterilen Inflammation zu untersuchen und so neue Therapieansätze für kardiovaskuläre

Erkrankungen wie Thrombose und Atherosklerose zu identifizieren. Mittels intravitaler 2-Photonen Mikroskopie können die pathophysiologischen Prozesse der Leukozytenrekrutierung bei steriler Entzündung im Rahmen der Thrombose und Atherosklerose *in vivo* untersucht werden. Das verbesserte Verständnis der zellulären und molekularen Abläufe im Rahmen der sterilen Entzündung erlaubt die Entwicklung neuer anti-inflammatorischer Strategien zur Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen.

2. Wissenschaftliche Arbeiten:

a. Der Einfluss von Perizyten auf die sterile Inflammation

Perizyten bilden zusammen mit Endothelzellen die Gefäßwand der Mikrozirkulation. Von abluminal umhüllen sie das Endothel und sind an der Regulation der Gefäßpermeabilität sowie im Rahmen der Angiogenese an der Stabilisierung neu entstandener Gefäße beteiligt (Stark et al., 2018a). Dabei gibt es unterschiedliche Populationen, die anhand ihrer Lokalisation entlang des Gefäßsystems sowie ihrer Markerexpression unterschieden werden können: zum einen NG2⁺αSMA⁺ Perizyten entlang von Arteriolen und Kapillaren; zum anderen NG2⁻αSMA⁺ Perizyten an postkapillären Venolen. In einer Publikation aus dem Jahr 2013 konnten wir erstmals zeigen, dass NG2⁺ Perizyten – die als mesenchymale Zellen nicht dem Immunsystem zugerechnet werden – einen entscheidenden Beitrag zur sterilen Entzündungsreaktion leisten (Stark et al., 2013). Als Gewebezellen müssen Perizyten nicht zum Entzündungsherd rekrutiert werden, sondern können unmittelbar auf Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren. Dafür verfügen sie über ein breites Repertoire an Rezeptoren – wie etwa Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, N-formyl peptide Rezeptor FPR2 und den tumor necrosis factor Rezeptor TNFR1 – womit Perizyten die Freisetzung von DAMPs detektieren können. Werden Perizyten *in vitro* über diese Rezeptoren stimuliert, so führt dies zur vermehrten Produktion und Mobilisation von ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) auf die Zelloberfläche. Dies wiederum vermittelt die Interaktion mit Monozyten und neutrophilen Granulozyten *in vitro*. Um die *in vivo* Relevanz dieses Befundes zu überprüfen wurde ein Mausmodell der sterilen Inflammation verwendet, bei dem durch lokale Injektion von fMLP oder TNFα die intravasale Rekrutierung, Extravasation sowie ungerichtete interstitielle Migration von myeloiden Leukozyten in der Dermis ausgelöst wird. Die dadurch hervorgerufene Entzündungsreaktion wurde mittels intravitaler 2-Photonenmikroskopie mit subzellulärer Auflösung in 3D untersucht, um so Interaktionen zwischen Perizyten und myeloiden Leukozyten *in vivo* analysieren zu können. Dies wurde durch transgene Mauslinien ermöglicht bei denen unter dem NG2 (neuron glia protein 2) Promotor das rot fluoreszierende Protein DsRed exprimiert wird (NG2DsRed Maus). Durch Generierung von Knochenmarkchimären können sowohl Perizyten als auch die unterschiedlichen Populationen myeloider Leukozyten untersucht werden: (1) mit Spendertieren der *LysMeGFP* Linie – bei denen das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter Kontrolle des LysM-Promotors exprimiert wird, womit myeloide Leukozyten und insbesondere neutrophile Granulozyten visualisiert werden können – oder (2) mit Spendertieren

der *CX3CR1eGFP* Linie, wodurch Monozyten und Makrophagen mit GFP markiert sind. Unter Verwendung dieser Knochenmarkchimären konnten wir zeigen, dass es *in vivo* zu Interaktionen zwischen myeloiden Leukozyten und NG2⁺ Perizyten während der interstitiellen Migration kommt, die migrierenden Leukozyten also an den immobilten Perizyten von der abluminalen Seite her adhären (siehe **Abbildung 1A**). Die Extravasation der myeloiden Leukozyten wurde durch die lokale Injektion von TNF α oder fMLP hervorgerufen. Dabei verlangsamt sich die Migrationgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen bei der Interaktion mit Perizyten deutlich (siehe **Abbildung 1B, C**). Diese Interaktion ist *in vivo* abhängig von ICAM-1, da eine Blockade dieses Adhäsionsmoleküls die Interaktionsdauer verkürzt und die Geschwindigkeit der Leukozyten während der Interaktion mit den Perizyten signifikant erhöht.

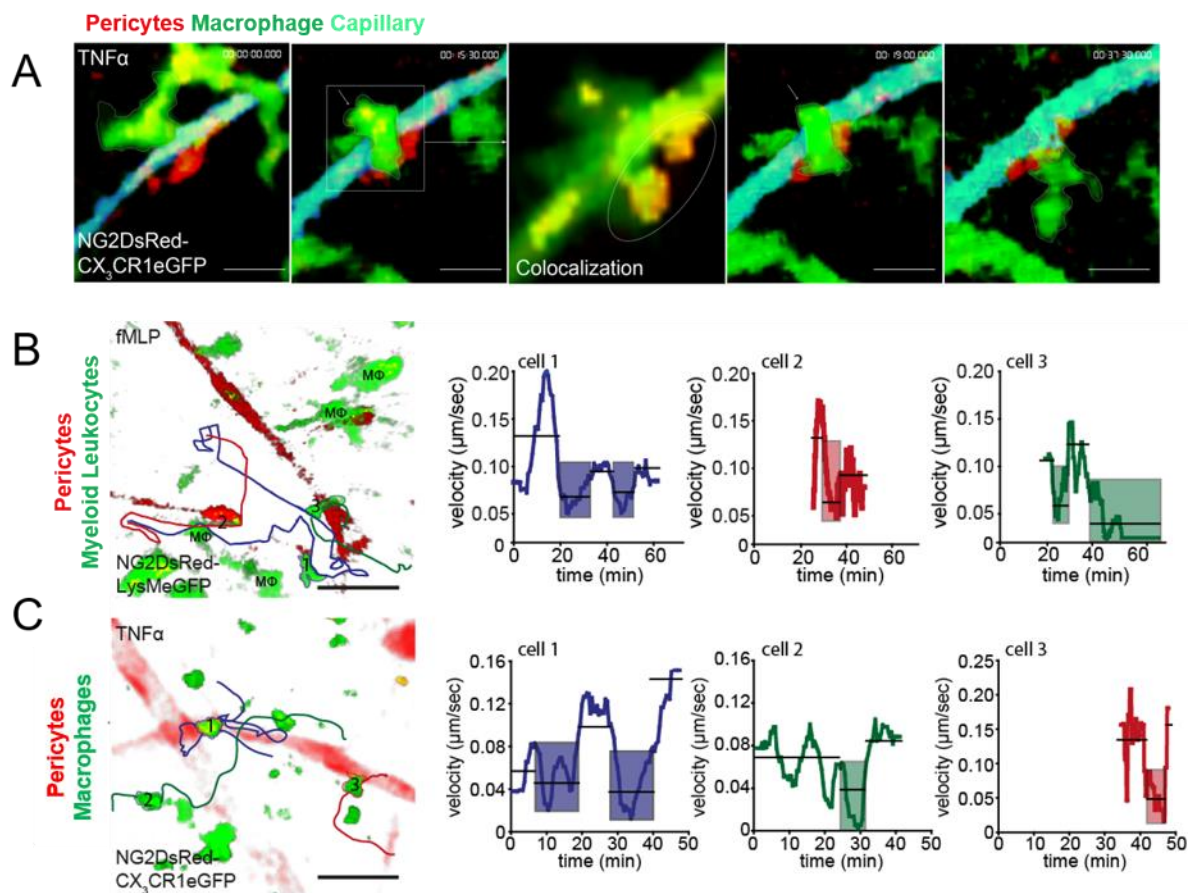


Abbildung 1: Interaktion zwischen Perizyten und myeloiden Leukozyten im Interstitium

A) Zeitserie der Interaktion zwischen einem Makrophagen (grün) und einem Perizyten (rot), der einer Kapillare anhaftet (türkis), visualisiert mittels intravitaler 2-Photonen Mikroskopie in der Haut einer *NG2DsRed;CX3CR1eGFP* Chimäre. Kolokalisation zwischen rotem und grünem Kanal im mittleren Bild in gelb dargestellt. Die Entzündung wurde mittels s.c. Injektion von TNF α ausgelöst. Maßstab 30 μ m. **B)** Links: Repräsentatives Bild der Migrationswege myeloider Leukozyten (grün) in Relation zu Perizyten (rot) in der Haut nach s.c. fMLP Injektion visualisiert mittels intravitaler 2-Photonen Mikroskopie in einer *NG2DsRed;LysMeGFP* Chimäre. Rechts: Geschwindigkeitsprofile der myeloiden Leukozyten, Boxen zeigen Interaktionen mit Perizyten an. Linie zeigt Mittelwert der Geschwindigkeit des jeweiligen Migrationsstadiums. Maßstab 50 μ m. **C)** Links: Repräsentatives Bild der Migrationswege von Makrophagen (grün) in Relation zu Perizyten (rot) in der Haut nach s.c. TNF α Injektion visualisiert mittels intravitaler 2-Photonen Mikroskopie in einer *NG2DsRed;CX3CR1eGFP* Chimäre. Rechts: Geschwindigkeitsprofile der Makrophagen, Boxen zeigen Interaktionen mit Perizyten an. Linie zeigt Mittelwert der Geschwindigkeit des jeweiligen Migrationsstadiums. Maßstab 50 μ m.

Weiterhin ergab sich aus den Geschwindigkeitsprofilen der myeloiden Leukozyten die Vermutung, dass es sich bei der Interaktion mit Perizyten nicht um ein zufälliges Ereignis handelt: Unmittelbar vor dem Kontakt mit den Perizyten kommt es zu einer deutlichen Beschleunigung der myeloiden Leukozyten (siehe **Abbildung 1B, C**). Zudem zeigte die Analyse der Zellmorphologie eine deutliche Polarisierung der Leukozyten bei der Annäherung an die Perizyten, was eine gezielte Chemotaxis der Immunzellen nahelegt. Mittels Chemotaxis Assays wurde dies weiter *in vitro* untersucht, wobei sich bestätigte, dass aktivierte Perizyten eine chemotaktische Wirkung sowohl auf neutrophile Granulozyten als auch auf Monozyten haben. Um genauer zu bestimmen, welche von Perizyten freigesetzten Mediatoren die Migration myeloider Leukozyten auslösen, untersuchten wir die Expression von Chemokinen durch Perizyten mittels rtPCR und ELISA. Hierbei zeigte sich, dass Perizyten eine Vielzahl an Chemokinen und Cytokinen produzieren und vor allem CCL2, CXCL8 und MIF (macrophage migration-inhibitory factor) nach Stimulation sezernieren. Eine Blockierung dieser Mediatoren hatte auch eine signifikant verminderte Chemotaxis von myeloiden Leukozyten zu Perizyten zur Folge, wobei MIF als einziger Mediator sowohl einen Effekt auf neutrophile Granulozyten als auch auf Monozyten hatte. Daher wurde die Bedeutung von MIF für die Interaktion von Perizyten und myeloiden Leukozyten im Detail untersucht: MIF war bereits bei ruhenden Perizyten in großen Mengen im Zytoplasma zu finden und wurde nach Stimulation an die Oberfläche der Perizyten mobilisiert, was sowohl *in vitro* mittels Immunfluoreszenzfärbung als auch *in vivo* mittels Immunhistologie und Färbung von Gewebeproben durch *whole mount staining* nachweisbar war. Dies bestätigte die vermehrte Ansammlung von MIF um NG2⁺ Perizyten im Gewebe mit dreidimensionaler Auflösung. Um zu untersuchen, ob Perizyten auch *in vivo* einen chemotaktischen Effekt auf myeloide Leukozyten während interstitieller Migration haben, verwendeten wir erneut *NG2DsRed;LysMeGFP* oder *CX3CR1eGFP* Knochenmarkchimären mit Injektion von fMLP bzw. TNFalpha, um eine ungerichtete interstitielle Migration auszulösen. Über die Zeit kam es dabei zur zunehmenden Akkumulation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten um das Perizyten-Netzwerk *in vivo*, was durch die Weiterentwicklung von *heatmaps*, die die dynamisch Dichte von Zellen im Zeitverlauf durch Farbkodierung visualisieren, gezeigt werden konnte. Durch automatische Detektion der myeloiden Leukozyten kann so deren Verteilung im interstitiellen Raum in Bezug auf das immobile Perizytennetzwerk analysiert werden. Dadurch konnte *in vivo* gezeigt werden, dass es bei ungerichteter interstitieller Leukozytenmigration zu einer Ansammlung myeloider Leukozyten um NG2⁺ Perizyten kommt, was durch MIF vermittelt wird und damit eine chemotaktische Reaktion darstellt.

Nachdem wir gezeigt hatten, dass Perizyten chemotaktisch auf myeloide Leukozyten wirken, wollten wir im nächsten Schritt untersuchen, ob es für die Immunzellen einen Vorteil bietet, mit Perizyten in Kontakt zu treten oder in ihrer Umgebung zu migrieren. Eine detaillierte Analyse des Migrationsverhaltens zeigte tatsächlich, dass myeloide Leukozyten, die mit Perizyten interagieren, effizienter durch das Gewebe migrieren als Zellen, die nicht mit Perizyten interagieren: Die

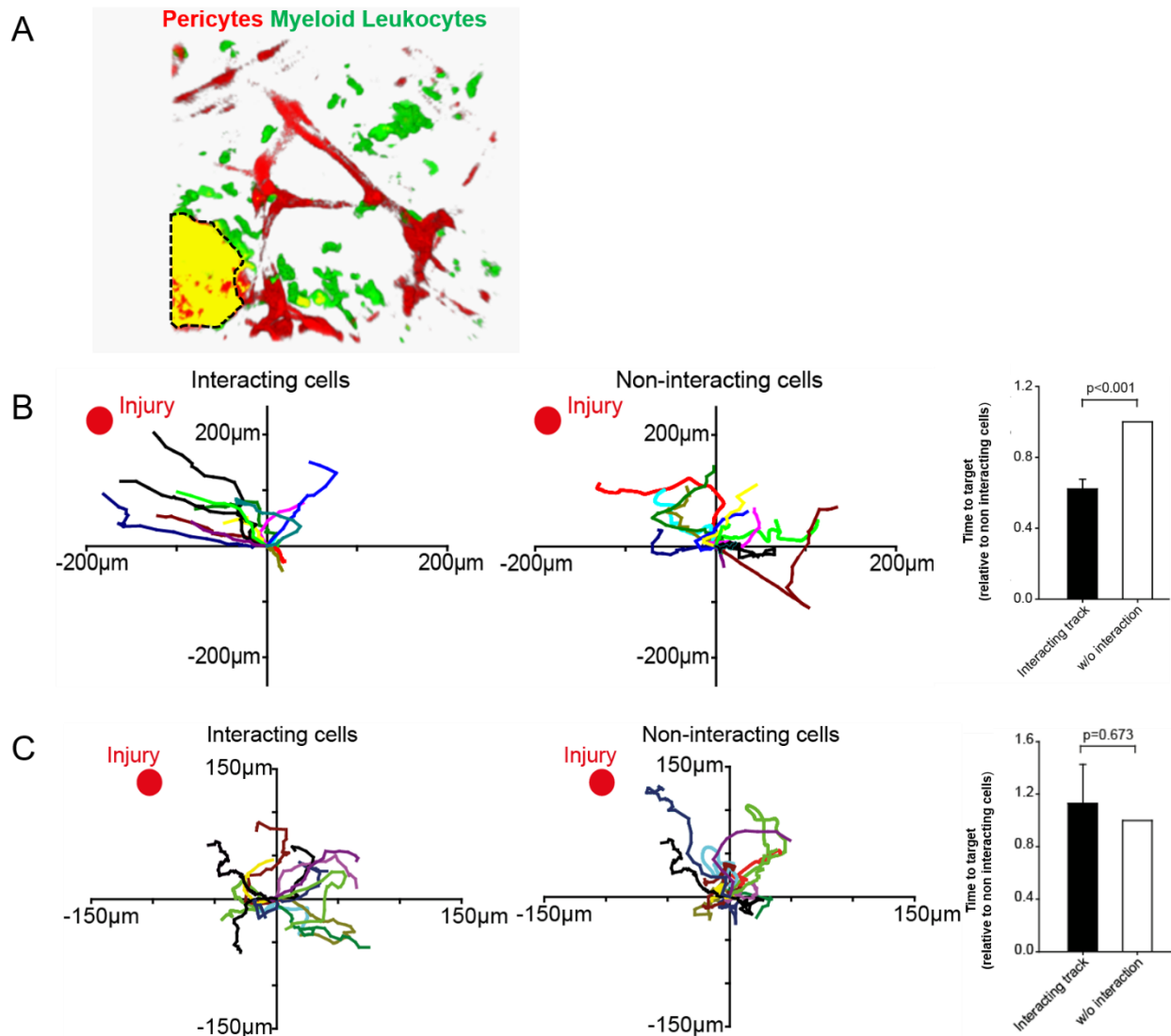


Abbildung 2: Perizyten unterstützen die zielgerichtete Migration myeloider Leukozyten bei steriler Inflammation abhängig von MIF

A) Rekrutierung myeloider Leukozyten (grün) zu einer Laserverletzung (gelb, gestrichelte Linie) und Interaktion mit Perizyten (rot) visualisiert mittels intravitaler 2-Photonen Mikroskopie in der Haut einer *NG2DsRed;LysMeGFP* Chimäre. **B)** Links: Migrationswege mit Perizyten interagierender und nicht-interagierender myeloider Leukozyten in Relation zur Laserverletzung (roter Punkt). Rechts: Relative Zeit bis zum Erreichen der Laserverletzung mit Perizyten interagierender und nicht-interagierender myeloider Leukozyten mit gleichem Startabstand zur Laserverletzung. **C)** Links: Migrationswege mit Perizyten interagierender und nicht-interagierender myeloider Leukozyten in Relation zur Laserverletzung (roter Punkt) in der Haut und Injektion des MIF Antagonisten ISO-1. Rechts: Relative Zeit bis zum Erreichen der Laserverletzung mit Perizyten interagierender und nicht-interagierender myeloider Leukozyten mit gleichem Startabstand zur Laserverletzung.

interagierenden Zellen bewegten sich schneller und zielgerichteter durch das Gewebe, wodurch sie größere Gewebeareale nach Entzündungsherden absuchen konnten. Auch war eine Assoziation schnell migrierender Zellen in unmittelbarer Umgebung der Perizyten nachweisbar, sodass das Perizytennetzwerk Wege für eine effiziente Navigation der Immunzellen durch das Gewebe bietet. Im Gegensatz dazu wiesen langsam migrierende Leukozyten eine gleichmäßige Verteilung im Gewebe auf, ohne Assoziation zu den Perizyten. Weiterhin untersuchten wir, ob Perizyten auch die Aktivität und Effektorfunktion von myeloiden Leukozyten beeinflussen. *In vitro* hatte die Inkubation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten mit konditioniertem Medium

von aktivierten Perizyten im Vergleich zur Inkubation mit Medium ohne Perizyten eine deutlich gesteigerte Aktivierung dieser Zellen zur Folge. Zudem induzierten Perizyten die vermehrte Expression von TLRs, Integrinen und Matrix Metalloproteinasen in myeloiden Leukozyten, was die Detektion von Entzündungsherden sowie die interstitielle Migration verbessert. Daneben verlängerten Perizyten das Überleben von neutrophilen Granulozyten, die normalerweise nur kurz im interstitiellen Gewebe überleben. Damit bietet die Interaktion mit Perizyten für myeloide Leukozyten mehrere Vorteile: 1) Sie werden aktiviert und können Entzündungsherde besser detektieren; 2) Neutrophile Granulozyten können durch ihre verlängerte Überlebensdauer im Gewebe länger nach Entzündungsherden suchen; 3) Durch die verbesserte Motilität können myeloide Zellen besser durch das Gewebe migrieren.

Um dies nun auch *in vivo* zu bestätigen, analysierten wir, ob die Interaktion mit Perizyten auch einen Vorteil bietet bei der Reaktion auf einen lokalen sterilen Entzündungsreiz, bei dem eine gezielte Migration der myeloiden Leukozyten notwendig ist. Hierfür wird durch Fokussierung des Laserstrahls des 2-Photonen Mikroskops eine Nekrose in der Dermis des Ohrs erzeugt, ohne dass die Epidermis dabei verletzt wird. Durch Verwendung von *NG2DsRed;LysMeGFP* oder *CX3CR1eGFP* Knochenmarkchimären kann so die Entzündungsreaktion *in vivo* mittels intravitraler 2-Photonen Mikroskopie visualisiert und analysiert werden (siehe **Abbildung 2A**). Interessanterweise wanderten die mit den Perizyten interagierenden myeloiden Leukozyten deutlich zielgerichteter zum Nekrosefokus als nicht interagierende Zellen. Zudem hatte die Interaktion mit den Perizyten eine deutliche Beschleunigung der Migrationsgeschwindigkeit zur Folge, sodass die interagierenden neutrophilen Granulozyten und Makrophagen deutlich schneller am Entzündungsherd eintrafen (siehe **Abbildung 2B**). Diese Vorteile bei zielgerichteter sowie ungerichteter interstitieller Migration myeloider Leukozyten sind abhängig von MIF, da eine Blockade dieses Mediators den Effekt der Perizyten auf das Migrationsverhalten neutralisierte (siehe **Abbildung 2C**). Damit konnten wir erstmals zeigen, dass Perizyten aktiv an der Reaktion des angeborenen Immunsystems bei steriler Entzündung teilnehmen. Als gewebständige mesenchymale Zellen sind sie in der Lage Mediatoren der sterilen Entzündung zu detektieren und reagieren drauf mit der Mobilisation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 sowie mit der Freisetzung des chemotaktischen Faktors MIF. Dies ermöglicht die Interaktion mit myeloiden Leukozyten während interstitieller Migration, was die Aktivierung dieser Zellen zur Folge hat. Durch die verbesserte Detektion von inflammatorischen Mediatoren und die effizientere Migration durch das Gewebe haben Perizyten somit einen verstärkenden Einfluss auf die Effektorfunktion myeloider Leukozyten bei steriler Inflammation.

b. Atheroprotektive Effekte des Chemokins CCL2 im Kompartiment der Gefäßwand

Um die Bedeutung dieses Mechanismus in einem kardiovaskulär relevanten Krankheitsbild zu untersuchen, wurde in einer zur Publikation eingereichten Arbeit die Rolle von glatten Gefäßmuskellzellen (SMCs) in der Atherosklerose untersucht. Diese wird durch ein systemisches Ungleichgewicht im Lipid- und Glukosestoffwechsel verursacht, was eine durch Chemokine

koordinierte lokale Immunantwort an Prädispositionsstellen in großen Arterien auslöst (Weber and Noels, 2011). Die wichtigsten zellulären Komponenten der arteriellen Gefäßwand sind SMCs, die unter anderem das Proteoglykan NG2 exprimieren (Grako and Stallcup, 1995; Ozerdem et al., 2001; She et al., 2016; Terada et al., 2006). SMCs können je nach Umweltfaktoren schädliche und schützende Wirkungen bei Atherosklerose haben (Bennett et al., 2016). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese Zellen in der Atherogenese einen sehr variablen Phänotyp aufweisen und sich Klf4-abhängig (*Krüppel like factor 4*) in makrophagenähnliche Zellen umwandeln können, welche die Plaquebildung verstärken (Shankman et al., 2015). Die schützende Wirkung von SMCs auf die Atherosklerose wird durch die Aktivierung des Pluripotenzfaktors Oct-4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) beeinflusst, da die SMC-spezifische Deletion von Oct-4 zu einer Destabilisierung der Plaque führt (Cherepanova et al., 2016). Darüber hinaus konnten wir bereits zeigen, dass geweberesidente nicht-Immunzellen der Gefäßwand die Immunantworten beeinflussen können (Stark et al., 2013). Deshalb wurde in diesem Projekt untersucht, wie arterielle SMCs die schädliche Immunantwort bei Atherosklerose beeinflussen.

Die Atherogenese ist gekennzeichnet durch die Anhäufung von Lipoproteinen, insbesondere Low-Density-Lipoprotein (LDL), in der Gefäßwand von Arterien (Weber and Noels, 2011). Interessanterweise kommt es bei der menschlichen Atherosklerose zur Ablagerung großer Mengen an Lipiden vor dem Auftreten von Schaumzellen (Nakashima et al., 2007; Napoli et al., 1997). Daher werden gewebsresidente Zellen bereits vor der Rekrutierung von Makrophagen in den entstehenden Plaque atherogenen Mediatoren ausgesetzt. Es hat sich gezeigt, dass SMCs mehrere Rezeptoren für die Aufnahme von Lipiden exprimieren (Mietus-Snyder et al., 2000; Zingg et al., 2002). Lipidexposition von SMCs führt zur Sekretion proinflammatorischer Mediatoren, die *in vitro* die Adhäsion von Makrophagen an SMCs hervorrufen (Barlic et al., 2007; Klouche et al., 2000). Dies wird durch die Exposition der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf der Oberfläche von SMCs vermittelt. Darüber hinaus modulieren SMCs die Expression von Scavenger-Rezeptoren und die Apoptose von Makrophagen *in vitro* (Braun et al., 1999; Cai et al., 2004a, b). Außerdem sind TLRs an der Erkennung atherogener DAMPs wie HMGB1 oder dsDNA beteiligt und induzieren eine proinflammatorische Reaktion bei Atherosklerose, welche die Plaquebildung fördert (Kanellakis et al., 2011; Zimmer et al., 2015). HMGB1 kann je nach Redoxzustand chemotaktisch (Thiolform) oder aktivierend (Disulfidform) wirken (Venereau et al., 2012). Die atherogene Wirkung von DAMPs wird hauptsächlich durch TLR2 und TLR4 durch das Signalprotein Myd88 (*myeloid differentiation primary response 88*) vermittelt (Curtiss and Tobias, 2009; Seimon et al., 2010). Es bleibt jedoch unklar, wie SMCs auf die Stimulation dieser Rezeptoren *in vivo* reagieren und wie dies die Atherogenese beeinflusst.

Das Chemokin CCL2, das auch von SMCs freigesetzt wird, kontrolliert die systemische Leukozytenmigration und ist ein wesentlicher Vermittler der Monozytenakkumulation in atherosklerotischen Läsionen (Combadiere et al., 2008; Saederup et al., 2008; Serbina and Pamer, 2006; Shi et al., 2011; Tacke et al., 2007). Obwohl bekannt ist, dass SMCs chemotaktische

Mediatoren freisetzen, ist unklar, wie dies die Leukozytenrekrutierung und die Bildung atherosklerotischer Plaques *in vivo* beeinflusst.

In dieser Arbeit konnte durch intravitale 2-Photonen-Mikroskopie gezeigt werden, dass NG2⁺ SMCs intensiv mit Makrophagen und Neutrophilen *in vivo* interagieren, was zur Retention myeloider Leukozyten im Schulterbereich des Plaques und zur Verringerung der Akkumulation in der Nekrosezone führt. Dies wird durch die Induktion von Chemotaxe in Makrophagen mittels SMC-basiertem CCL2 erreicht. SMCs dedifferenzieren während der Atherogenese, die mit einer ausgeprägten Myd88-abhängigen Hochregulation von CCL2 *in vivo* verbunden ist. *In vitro* führt die Aktivierung von humanen koronaren SMCs durch Stimulation von PRRs zur Sekretion von CCL2 sowie zur Exposition von ICAM-1 und VCAM-1. Entsprechend reduziert die Myd88-abhängige Freisetzung von CCL2 aus dedifferenzierten NG2⁺ SMCs das Plaquewachstum bei fortgeschrittener Atherosklerose *in vivo*. NG2⁺ SMCs formen daher die Immunantwort bei Atherosklerose durch die Sekretion von CCL2, was die maladaptive Akkumulation myeloider Leukozyten im Plaquekern begrenzt.

Um die Verteilung der NG2⁺ SMCs und ihre Wechselwirkungen mit myeloiden Leukozyten zu charakterisieren, wurde zunächst die frühe und fortgeschrittene Plaquebildung *ex vivo* untersucht. In frühen Stadien der Atherosklerose (6 Wochen HFD (high fat diet)) bildeten NG2⁺ SMCs intensive Kontakte zu Makrophagen innerhalb des Plaques aus, in späteren Stadien (12 Wochen HFD) waren diese jedoch nur im Schulterbereich der Plaques zu finden (siehe **Abbildungen 3A**). In diesem Zusammenhang nahmen die Kontakte zwischen Makrophagen und NG2⁺ SMCs im Laufe der Zeit ab, blieben aber häufige Ereignisse. Darüber hinaus zeigten neutrophile Granulozyten Kontakte mit SMCs in frühen Plaques und im Schulterbereich fortgeschrittener Plaques, ohne signifikante Veränderungen der Häufigkeit im Zeitverlauf.

Um die Relevanz und Dynamik der Wechselwirkungen zwischen NG2⁺ SMCs und myeloiden Leukozyten *in vivo* zu untersuchen, wurde intravitale 2-Photonen-Mikroskopie in der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand durchgeführt. Dazu wurden NG2-DsRed;CX3CR1-GFP/+;ApoE^{-/-} sowie NG2-DsRed;LysM-eGFP/+;ApoE^{-/-} Mäuse genutzt, die nach 14 Wochen HFD für die *in vivo* Versuche verwendet wurden. Dabei waren häufige Interaktionen zwischen NG2⁺ SMCs und LysM⁺ myeloischen Leukozyten in der Schulterregion der Plaques *in vivo* nachweisbar, wobei 46% der LysM⁺ Zellen dynamische und die restlichen statische Interaktionen mit SMCs zeigten. Während der Interaktionen wurde die Fortbewegung von LysM⁺-Zellen signifikant reduziert, was darauf hindeutet, dass NG2⁺ SMCs die Migration myeloider Leukozyten einschränken. Entsprechend wurden LysM⁺ myeloide Leukozyten von NG2⁺ SMCs zurückgehalten und die Leukozyten bildeten Fortsätze zu den SMCs aus.

Um das Verhalten von Makrophagen in Bezug auf NG2⁺ SMCs genauer zu untersuchen, wurden NG2-DsRed;CX3CR1-GFP/+;ApoE^{-/-} Mäuse *in vivo* analysiert. Mittels intravitale 2-Photonen-Mikroskopie beobachteten wir viele statische Interaktionen zwischen NG2⁺ SMCs und CX3CR1⁺

Makrophagen nahe dem Plaquekern. Darüber hinaus gab es dynamische Interaktionen von beweglichen CX3CR1⁺-Zellen *in vivo*, die auch nicht direkt in den Plaquekern wanderten, sondern ein tangenciales Migrationsverhalten mit sequenziellen Interaktionen mit NG2⁺ SMCs im Schulterbereich des Plaques aufwiesen. Detaillierte Analysen der Interaktionen zeigten, dass sowohl CX3CR1⁺ als auch LysM⁺-Zellen beschleunigten und polarisierten, wenn sie sich *in vivo* NG2⁺ SMCs näherten, was auf eine chemotaktische Wirkung von SMCs auf myeloische Leukozyten hindeutet. Darüber hinaus verlangsamten LysM⁺-Zellen ihre zielgerichtete Migration bei Interaktionen mit SMCs. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass myeloide Leukozyten im Rahmen der Atherosklerose intensiv mit NG2⁺ SMCs in der Gefäßwand interagieren, die ihre Migration begrenzen und sie im Schulterbereich des Plaques zurückhalten.

Da wir nachweisen konnten, dass myeloide Leukozyten intensiv mit NG2⁺ SMCs innerhalb der Gefäßwand *in vivo* interagieren, wurde nun untersucht, wie dies durch SMCs vermittelt wird. Da SMCs während der Atheroprogression eine hohe Plastizität aufweisen, charakterisierten wir den Phänotyp der NG2⁺-Zellen innerhalb der Gefäßwand, welches ein etablierter Marker für SMCs ist (Grako and Stallcup, 1995; Ozerdem et al., 2001; She et al., 2016; Terada et al., 2006). Durch *ex vivo* 2-Photonen-Mikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass sich die Morphologie der SMCs und ihre Lokalisation relativ zum Plaque während der Atheroprogression in *NG2-DsRed;ApoE^{-/-}* Mäusen veränderte. Ohne HFD zeigten NG2⁺ SMCs eine einheitliche spindelförmige Morphologie, die sich innerhalb früher Plaques (nach 8 Wochen HFD) in eine abgerundete Form überführte. Nach 14 Wochen HFD konnten NG2⁺ SMCs jedoch kaum noch innerhalb der Plaques nachgewiesen werden, bildeten aber eine kreisförmige Wand aus spindelförmigen Zellen um den Plaquebereich. Darüber hinaus waren diese morphologischen Veränderungen mit Veränderungen in der Markerexpression verbunden: Ohne HFD exprimierten alle NG2⁺-Zellen (die nur in der Media vorhanden waren) in der A. carotis, dem Aortenbogen und der Aortenklappe den typischen SMC-Marker ACTA2, aber nicht PDGFR β . Allerdings nahm die Expression von ACTA2 in intimalen NG2⁺-Zellen nach 6 und 12 Wochen HFD progredient ab, ebenso wie die erworbene PDGFR β -Expression im Laufe der Zeit ebenfalls abnahm. Als Reaktion auf HFD wiesen NG2⁺-SMCs Merkmale einer Dedifferenzierung auf, die durch Herunterregulation von ACTA2 und Hochregulation des Pluripotenzmarkers Oct-4 charakterisiert ist, während für Klf4, LGALS3 oder Vimentin mRNA keine Veränderungen beobachtet werden konnten. Darüber hinaus gab es eine starke Hochregulation der mRNA von CCL2. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass NG2⁺ SMCs während der Atheroprogression dedifferenzieren und die Expression von CCL2 hochregulieren.

Da SMCs eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten *in vivo* aufweisen, wurde als nächstes untersucht, wie SMCs *in vitro* aktiviert werden. Dazu wurden humane glatte Muskelzellen der Koronararterien (HCASMCs) verwendet, da die Koronararterien klinisch die relevanteste Lokalisation der Atherosklerose sind. Hier konnte gezeigt werden, dass diese mit der Maschinerie zur Detektion steriler Entzündungsmediatoren ausgestattet sind, darunter die PRRs TLR2, TLR4 und TLR9. Diese wurden nach Stimulation mit den atherogenen Mediatoren Disulfid HMGB1

(TLR4/9), nicht-oxidierbares 3S-HMGB1 (TLR2/4), HSP60 (TLR9) oder dem TLR9-Agonisten ODN 2216 (TLR9) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen signifikant hochreguliert. Darüber hinaus führte die Stimulation von HCASMCs zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen: An der Atherosklerose beteiligte Mediatoren wie TNF α , oxLDL, ODN 2216, dsDNA, HSP60/70 sowie die verschiedenen Redoxformen von HMGB1 führten zu einem proinflammatorischen Phänotyp in HCASMCs. Die meisten dieser Mediatoren hatten eine Hochregulierung von VCAM-1 zur Folge, aber nur TNF α und ODN 2216 erhöhten die ICAM-1-Expression. Aktivierte HCASMCs zeigten ein bestimmtes Muster der Chemokin-Expression: CCL2 wurde als Reaktion auf fast alle getesteten Mediatoren hochreguliert, außer oxLDL und hohen Konzentrationen von reduziertem HMGB1. Die Freisetzung von CCL2 wurde durch ODN 2216 und dsDNA induziert, durch oxLDL aber vermindert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HCASMCs unterschiedlich auf atherogene Mediatoren reagieren, die die Freisetzung von Chemokinen und die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen induzieren.

Da HCASMCs in der Lage sind, das Chemokin CCL2 bei Stimulation mit atherogenen Mediatoren zu sezernieren, wurde analysiert, ob und wie sie die Chemotaxis von Makrophagen induzieren. Wir fanden heraus, dass bereits das konditionierte Medium von ruhenden HCASMCs chemotaktische Effekte im Vergleich zu Medium ausübte, welche durch Stimulation von HCASMCs mit dsDNA, HMGB1 und HSP60 verstärkt werden konnten. Chemotaxis von Makrophagen wurde durch CCL2 vermittelt, da die Blockade durch einen CCL2 blockierenden Antikörper ihre Migration signifikant verringerte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HCASMCs chemotaktische Effekte auf Makrophagen haben, die durch CCL2 vermittelt werden. Neben der chemotaktischen Wirkung könnten HCASMCs auch die Funktionalität der myeloischen Leukozyten beeinflussen. Als Reaktion auf Inkubation mit konditioniertem Medium von HCASMCs zeigten Makrophagen eine deutlich gesteigerte Expression der Retentionsfaktoren Netrin-1 (mit konditioniertem Medium aus dsDNA und 3S-HMGB1 stimulierten HCASMCs) und Semaphorin 3E (dsDNA, HSP60, oxLDL konditioniertes Medium) (van Gils et al., 2012; Wanschel et al., 2013). Die Hochregulation von Netrin-1 und Semaphorin 3E in Monozyten war dabei abhängig von CCL2.

Im nächsten Schritt wurde die Bedeutung von CCL2 aus glatten Gefäßmuskelzellen für die Plaquebildung *in vivo* untersucht. Hier zeigte sich überraschenderweise, dass die Plaquebildung nach 14 Wochen HFD bei *NG2Cre+;CCL2fl/fl;ApoE^{-/-}* Mäusen signifikant erhöht war im Vergleich zu *NG2Cre-;CCL2fl/fl;ApoE^{-/-}* Geschwistertieren im Bereich des Aortenbogens sowie des Truncus barchiocephalicus (siehe Abbildungen 3B, C). *NG2Cre+;CCL2fl/fl;ApoE^{-/-}* Mäuse zeigten ein fast vollständiges Fehlen von CCL2 mRNA in der Aorta, was darauf hindeutet, dass NG2⁺ SMCs die Hauptquelle für dieses Chemokin in der Gefäßwand sind. Es gab jedoch keine Unterschiede in den systemischen CCL2-Spiegeln, im Cholesterinspiegel und im Körpergewicht zwischen den Gruppen. Die Plaques im Truncus barchiocephalicus von *NG2Cre+;CCL2fl/fl;ApoE^{-/-}* Mäusen wiesen deutlich größere Nekrosezonen auf sowie höhere Plaquestabilität im Vergleich zu *NG2Cre-;CCL2fl/fl;ApoE^{-/-}* Geschwistertieren (siehe **Abbildungen 3C**). Parallel dazu nahmen die Kontakte zwischen LGALS3⁺ Makrophagen und ACTA2⁺ SMCs in der NG2Cre⁺-Gruppe ab. Diese

überraschenden Befunde konnten auch in einer zweiten SMC-spezifischen Mauslinie bestätigt werden. Bei *Myh11CreERT;CCL2^{fl/fl};ApoE^{-/-}* Tieren wurde durch Tamoxifengabe nach 6 Wochen die CCL2 Expression in SMCs ausgeschaltet und nach 14 Wochen HFD zeigte sich ebenfalls eine deutlich vermehrte Plaquebildung in den Cre+ Tieren im Vergleich zu Cre- Geschwistertieren. Somit verhindert CCL2 aus SMCs die Ansammlung von Makrophagen im Plaquekern, wodurch das Plaquewachstum und die nekrotische Kernbildung begrenzt werden, destabilisiert aber die Faserkappe, indem Makrophagen im Schulterbereich des Plaques gehalten werden.

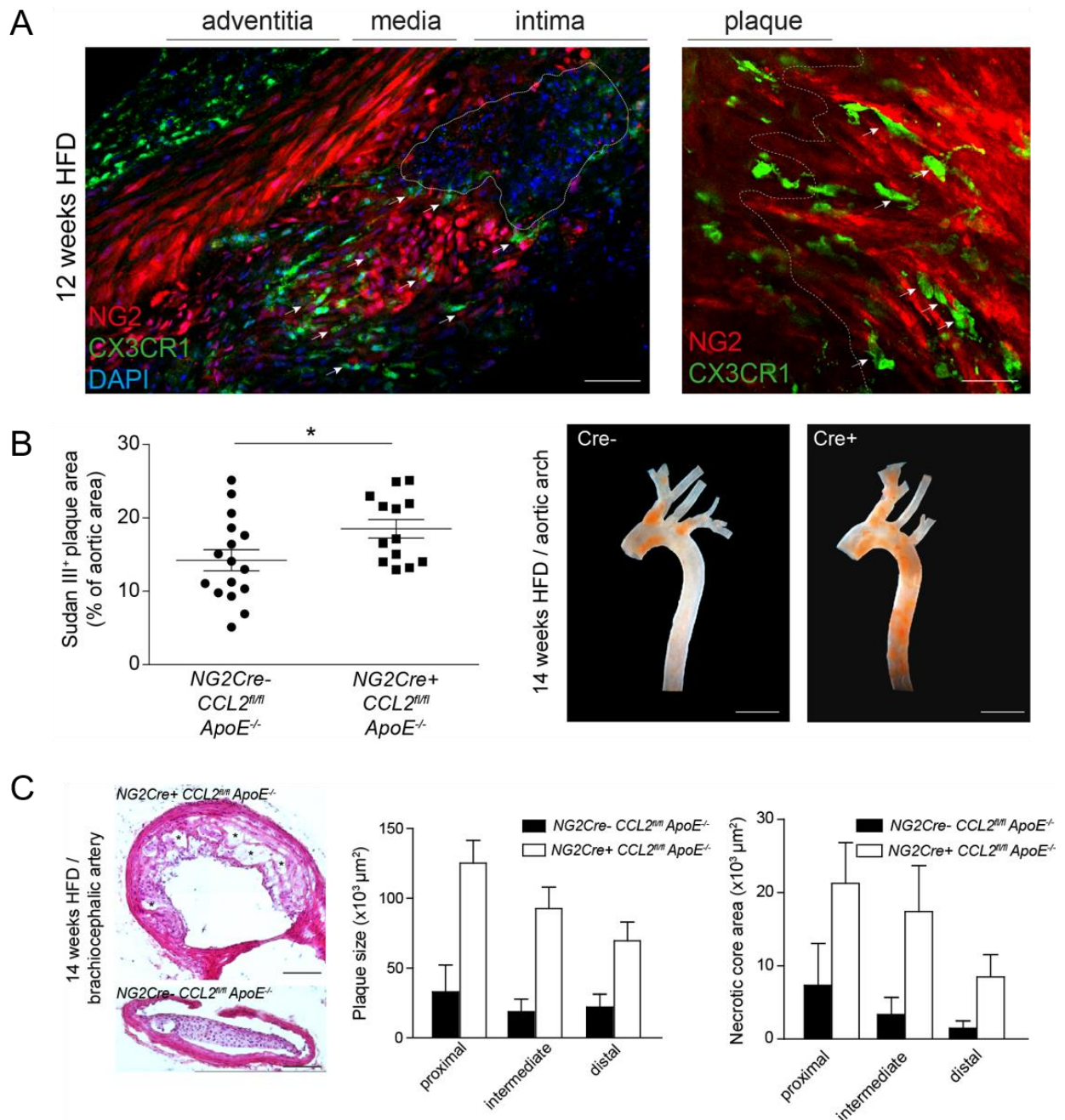


Abbildung 3: CCL2 aus glatten Gefäßmuskelzellen hat atheroprotektive Effekte

A) Links: Kontakte (Pfeile) zwischen glatten Gefäßmuskelzellen (rot, NG2) mit Makrophagen (grün, CX3CR1) in der Schulterregion eines atherosklerotischen Plaques (gestrichelte Linie) in der Aorta einer *NG2DsRed;CX3CR1eGFP,ApoE^{-/-}* Maus nach 12 Wochen fettreicher Ernährung (HFD). Zellkerne in blau (DAPI). Maßstab 50 μm. Rechts: Stärkere Vergrößerung der Kontakte (Pfeile) zwischen Makrophagen (grün) und glatten Gefäßmuskelzellen (rot) an der Grenze zum Kernbereich des Plaques (gestrichelte Linie), visualisiert mittels konfokaler Mikroskopie. Maßstab 30 μm. **B)** Links: Quantifizierung der Plaquebildung im Bereich des Aortenbogens in *NG2Cre⁺;CCL2^{fl/fl};ApoE^{-/-}* und *NG2Cre⁻;CCL2^{fl/fl};ApoE^{-/-}* Geschwistertieren nach 14 Wochen HFD. Rechts: Repräsentative Bilder der Plaquequantifizierung mittels makroskopischer Sudan III Färbung. Maßstab 200 μm. **C)** Links: Repräsentative Bilder der Hämatoxylin/Eosin Färbung des Truncus brachiocephalicus mit Nekrosezonen (Sterne) in *NG2Cre⁺;CCL2^{fl/fl};ApoE^{-/-}* und *NG2Cre⁻;CCL2^{fl/fl};ApoE^{-/-}* Geschwistertieren. Rechts: Quantifizierung der Plaquebildung und Nekrosezone im Bereich des Truncus brachiocephalicus. Maßstab 100 μm.

Da SMCs atherogene Mediatoren *in vitro* wahrnehmen, was zu ihrer Aktivierung und Interaktionen mit Makrophagen führt, wurde untersucht, wie eine gezielte Deletion von Myd88 in NG2⁺ SMCs die Plaquebildung beeinflusst. Dazu wurden *NG2Cre⁺;Myd88fl/fl;ApoE^{-/-}* Mäuse eingesetzt, die 14 Wochen HFD erhielten. Dies führte zu einer signifikant erhöhten Plaquebildung innerhalb der Aorta von *NG2Cre⁺;Myd88fl/fl;ApoE^{-/-}* Mäusen im Vergleich zu *NG2Cre^{-/-};Myd88fl/fl;ApoE^{-/-}* Geschwistertieren. Die Analyse der Gefäßwand zeigte eine signifikant verminderte Expression von CCL2 mRNA in *NG2Cre⁺;Myd88fl/fl;ApoE^{-/-}* Mäusen im Vergleich zu *NG2Cre^{-/-};Myd88fl/fl;ApoE^{-/-}* Geschwistertieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Detektorfunktion von NG2⁺ SMCs notwendig ist, um die Gefäßintegrität bei Atherosklerose zu erhalten, die durch eine MYD88-abhängige Erhöhung der CCL2-Expression vermittelt wird.

Obwohl die entzündliche Reaktion bei Atherosklerose in einem von SMCs dominierten Milieu stattfindet, war der Beitrag der SMCs zum immunologischen Aspekt dieses Prozesses unklar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SMCs die Immunantwort bei Atherosklerose *in vivo* durch ihre Freisetzung des Chemokins CCL2 modulieren, welches paradoxe atheroprotektive Effekte in der intimalen Nische hat. Die Dedifferenzierung von NG2⁺ SMCs führt über CCL2 zur Anziehung und Zurückhaltung von myeloiden Leukozyten im Schulterbereich der Plaques und verhindert, dass sie in den Plaquekern gelangen. Dies hat die Chemostase von Makrophagen zur Folge, die durch Hochregulierung der Retentionsfaktoren Netrin-1/Semaphorin 3E vermittelt wird, und die Plaquebildung reduziert. NG2⁺ SMCs formen daher die Immunantwort bei Atherosklerose, indem sie erstens die Akkumulation myeloider Leukozyten in der Nekrosezone limitieren und damit das Plaquewachstum reduzieren sowie zweitens myeloide Leukozyten im Schulterbereich aktivieren und die Plaques dadurch destabilisieren.

Diese Ergebnisse sind vor allem deshalb bemerkenswert, weil CCL2 als prototypisches proatherogenes Chemokin gilt, indem es die schädliche Anhäufung von Makrophagen in der Gefäßwand vermittelt (Gu et al., 1998; Koenen et al., 2009). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CCL2 aus SMCs auf lokaler Ebene in der Gefäßwand atheroprotektive Effekte hat, welche die Verteilung und Funktionalität von Makrophagen im Läsionsbereich beeinflussen. Dies deutet darauf hin, dass die systemischen proatherogenen Effekte von CCL2 hauptsächlich durch seinen Einfluss auf die Mobilisierung von myeloiden Leukozyten aus dem Knochenmark, ihre Aktivierung im Blutkreislauf und ihre Rekrutierung in das Endothel vermittelt werden (Dutta et al., 2012; Swirski et al., 2016). Entsprechend mildert ein kompletter Mangel an CCL2 die Atherosklerose bei Mäusen ab und verringert die lokale Makrophagenakkumulation (Gosling et al., 1999; Gu et al., 1998).

Zu klären blieb die Frage, wie die Retention von Makrophagen im Periplaquebereich durch CCL2 aus SMCs vermittelt wird. Im Rahmen der Atherosklerose wurden spezifische Retentionsfaktoren für Makrophagen identifiziert: Netrin-1 und Semaphorin 3E (Moore et al., 2013; van Gils et al., 2012; Wanschel et al., 2013). Netrin-1 begrenzt die Migration von Neutrophilen und Makrophagen durch seinen Rezeptor UNC5b in verschiedenen Entzündungsprozessen (Ly et al., 2005; Rosenberger et al., 2009; Wang et al., 2008). Dies ist auf die Induktion der Chemostase zurückzuführen, die die Makrophagen durch Interferenz mit der Rac1-Signalkaskade sowie

Zellpolarisation und -migration gegenüber anderen chemotaktischen Wirkstoffen wie CCL21 unempfindlich macht (van Gils et al., 2012). Semaphorin 3E ist in aktivierten Makrophagen bei Atherosklerose stark exprimiert, was die Aktinpolymerisierung und die Makrophagenmigration blockiert (Wanschel et al., 2013). Wir zeigen hier, dass SMCs menschlicher Koronararterien selektiv die Hochregulation von Netrin-1 und Semaphorin 3E in Makrophagen *in vitro* induzieren. Dies erklärt ihre Retention von Makrophagen in unmittelbarer Nähe zu SMCs im Schulterbereich der Plaques, was ihre Migration in die Nekrosezone des Plaques verhindert, welche ebenfalls chemotaktische Signale aussendet. Atherogene Mediatoren, die aus dem entzündlichen Umfeld stammen, können jedoch retinierte Makrophagen aktivieren, was zur Destabilisierung des Plaques führen kann. Somit begrenzt CCL2 aus SMCs das Plaquewachstum auf Kosten der Destabilisierung des Plaques. Daher haben unsere Ergebnisse umfassende Implikationen für die Bedeutung von Chemokinen bei Entzündungskrankheiten, deren Rolle abhängig vom Kompartiment und der zellulären Herkunft untersucht werden sollte.

c. Eosinophile Granulozyten fördern die Bildung atherosklerotischer Plaques und stabilisieren die arterielle Thrombose durch die Bildung von *extracellular traps*

In einer weiteren zur Publikation eingereichten Arbeit beschäftigten wir uns damit, ob neben neutrophilen Granulozyten und Monozyten auch weitere Zelltypen des angeborenen Immunsystems an Atherosklerose und Thrombusbildung beteiligt sind. Hier legen zahlreiche klinische Untersuchungen nahe, dass die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert ist. Zu welchem spezifischen Aspekt der Pathophysiologie sie aber beitragen und ob sie mit Thrombozyten als Schlüsselfaktoren dieser Prozesse interagieren, ist unbekannt. Bei der Atherosklerose korrelieren erhöhte Blutspiegel des eosinophilen zytotoxischen Effektorproteins eosinophil cationic protein (ECP) mit dem Schweregrad arterieller Stenosen. In histologischen Untersuchungen an stabilen humanen atherosklerotischen Plaques waren eosinophile Granulozyten zwar nicht nachweisbar, wurden aber in rupturierten Plaques detektiert (Niccoli et al., 2010; Xia et al., 2016). Darüber hinaus wird das potente Eosinophilen Chemokin und Aktivator CCL11 (Eotaxin-1) in atherosklerotischen Läsionen überexprimiert (Haley et al., 2000; Pertiwi et al., 2018; van Dijk et al., 2016). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass aktivierte eosinophile Granulozyten eine Rolle bei der Atherosklerose spielen könnten, möglicherweise verbunden mit ihrer Aktivierung und der Ausschüttung ihrer zytotoxischen Granula. Die Granula eosinophiler Granulozyten enthalten die kationischen Proteine major basic protein (MBP), eosinophil peroxidase (EPX), ECP und eosinophil neurotoxin (EDNT), welche Gewebeschäden und Entzündungen verursachen (Acharya and Ackerman, 2014). Eosinophile Granulozyten sind in mehreren klinischen Studien auch direkt mit arterieller Thrombose assoziiert: Unsere Gruppe konnte die Akkumulationen von eosinophilen Granulozyten in Myokardinfarkt-Thromben zeigen (Riegger et al., 2016). Darüber hinaus ist eine hohe Anzahl eosinophiler Granulozyten in Thromben mit einer erhöhten Thrombusgröße verbunden (Jiang et al., 2015). Ebenso fand eine genomweite Assoziationsstudie für

Sequenzvarianten, die die Anzahl systemischer eosinophiler Granulozyten beeinflussen, einen Zusammenhang mit Myokardinfarkt (Gudbjartsson et al., 2009). Vor kurzem haben wir und andere eine prokoagulatorische Wirkung von eosinophilen Granulozyten durch die starke Anreicherung von aktiviertem TF auf diesem Zelltyp in einem murinen Modell der venösen Thrombose gezeigt (Moosbauer et al., 2007; Uderhardt et al., 2017). Ob es aber ein aktivierendes Zusammenspiel mit Thrombozyten gibt, die die arterielle Thrombose und Plaquebildung im Rahmen der Atherosklerose verstärken, ist unklar und wurde in diesem Projekt untersucht.

Da eosinophile Granulozyten an kardiovaskulären Ereignissen beteiligt sind, aber unklar ist, wie sie zum entzündlichen und thrombotischen Milieu beitragen, haben wir zunächst getestet, ob eosinophile Granulozyten die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen beeinflussen. Deshalb haben wir *ApoE*^{-/-} mit Eosinophilen-defizienten *Δdb/GATA1*^{-/-} Mäusen gekreuzt. Diese Mäuse sowie ihre Wildtyp-Geschwistertiere mit normalen Eosinophilenzahlen (*ApoE*^{-/-}; *Δdb/GATA1*^{+/+}) erhielten 13 Wochen lang eine cholesterinreiche Ernährung. Sowohl im Aortenbogen als auch auf Ebene der Aortenwurzel hatten Eosinophilen-defiziente Mäuse deutlich kleinere atherosklerotische Plaques (siehe **Abbildung 4A, B**). Dagegen war hinsichtlich des Körpergewichts und des Cholesterinspiegels kein Unterschied nachweisbar. Wie bereits für stabile humane atherosklerotische Plaques berichtet, wurden jedoch keine eosinophilen Granulozyten in murinen Läsionen gefunden (van Dijk et al., 2016). Um zu untersuchen, ob die Rekrutierung anderer Leukozytenpopulationen durch das Fehlen von eosinophilen Granulozyten beeinträchtigt wird, wurde die Infiltration entzündlicher Immunzellen in die Plaques untersucht. *ApoE*^{-/-}; *Δdb/GATA1*^{+/+} Tiere zeigten deutlich mehr Neutrophile und Makrophagen in den Plaques, zudem waren vermehrt glatte Gefäßmuskelzellen im Vergleich zu Eosinophilen-defizienten *ApoE*^{-/-}; *Δdb/GATA1*^{-/-} Geschwistertieren zu finden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eosinophile Granulozyten die Entzündungsreaktion bei Atherosklerose und damit die Plaquebildung fördern. Darüber hinaus deutet ihr Fehlen in den Läsionen eher auf eine systemische Wirkung von eosinophilen Granulozyten als auf eine lokale Wirkung innerhalb des Plaques selbst hin.

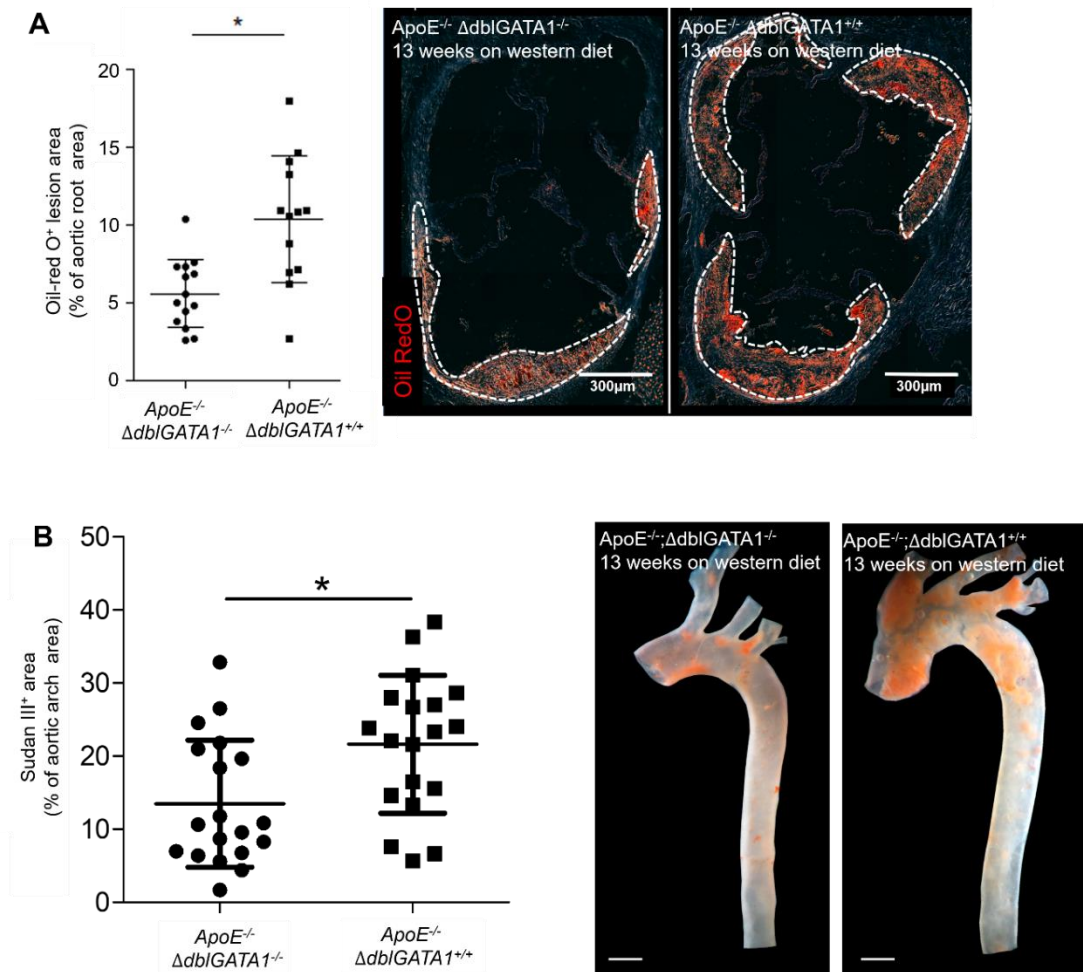


Abbildung 4: Eosinophile Granulozyten fördern die Entstehung atherosklerotischer Plaques

A) Links: Quantifizierung der Plaquebildung in der Aortenwurzel von Eosinophilen-defizienten *ApoE*^{-/-};*ΔdbiGATA1*^{-/-} Tieren im Vergleich zu *ApoE*^{-/-};*ΔdbiGATA1*^{+/+} Geschwistertieren nach 13 Wochen HFD. Rechts: Repräsentative Bilder der Oil-red O Färbung in histologischen Schnitten der Aortenwurzel. Die Gestrichelte Linie zeigt die Plaquefläche an. Maßstab 300 μm. **B)** Links: Quantifizierung der Plaquebildung in der Aorta ascendens von Eosinophilen-defizienten *ApoE*^{-/-};*ΔdbiGATA1*^{-/-} Tieren im Vergleich zu *ApoE*^{-/-};*ΔdbiGATA1*^{+/+} Geschwistertieren nach 13 Wochen HFD. Rechts: Repräsentative Bilder der makroskopischen Sudan III Färbung der Aorta. Maßstab 300 μm.

Um zu testen, ob eosinophile Granulozyten im Rahmen der Atherosklerose aktiviert werden, analysierten wir, ob es zu einem Anstieg Eosinophilen-stimulierender Faktoren bei *ApoE*^{-/-} Mäusen als Reaktion auf eine cholesterinreiche Ernährung kommt. Hier zeigten sich erhöhte Serumspiegel von CCL11, welches auch in Plaques und dem darüber liegenden Endothel vorhanden war. Zudem bildeten eosinophile Granulozyten vermehrt Komplexe mit Thrombozyten, was darauf hindeutet, dass ein Zusammenspiel zwischen diesen Zelltypen an der Förderung der Atherosklerose beteiligt sein könnte. Da Thrombozyten an der Atheroprogression beteiligt sind, untersuchten wir im nächsten Schritt, ob eosinophile Granulozyten die Plaquebildung fördern, indem sie die Thrombozytenadhäsion verstärken (Huo et al., 2003; Massberg et al., 2002). Um dies *in vivo* zu testen, untersuchten wir die Thrombozytenadhäsion in der A. carotis von *ApoE*^{-/-};*ΔdbiGATA1*^{-/-}, welche bei Eosinophilen-defizienten Mäusen deutlich beeinträchtigt war. Allerdings zeigten Thrombozyten *per se* keine Unterschiede in Bezug auf Anzahl, Aktivierungsstatus oder

Exposition von GPIb und von Willebrand Faktor (vWF). Eine weitere Determinante der Thrombozytenadhäsion ist die vWF-Exposition am Endothel, die bei eosinophilen-defizienten *ApoE*^{-/-} Mäusen *in vivo* stark reduziert war, was auch zu einem verminderten Plasmaspiegel von vWF führte. *In vitro* konnten bestätigt werden, dass aktivierte eosinophile Granulozyten die Exposition von vWF auf der Oberfläche von Endothelzellen induzieren, was bei ruhenden eosinophilen Granulozyten nicht der Fall war. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eosinophile Granulozyten die Atherosklerose durch vermehrte Exposition von vWF auf dem Endothel fördern, was zu einer erhöhten atherogenen Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand führt.

Nachdem wir gezeigt hatten, dass eosinophile Granulozyten die Thrombozytenadhäsion und Atheroprogression unterstützen, untersuchten wir als nächstes, ob sie auch die Thrombozytenakkumulation nach endothelialer Verletzung im Rahmen der Atherosklerose fördern. Um dies zu analysieren, wurde das FeCl₃ Modell der Thrombose in der A. carotis von Eosinophilen-defizienten *ApoE*^{-/-}; *Δdb|GATA1*^{-/-} Mäusen und Wildtyp Geschwistertieren verwendet. Die Zeit zwischen der Induktion der Thrombusbildung und dem Gefäßverschluss war bei Eosinophilen-defizienten und Wildtyp-Mäusen ähnlich. Auffallend war jedoch, dass es bei Thromben von Eosinophilen-defizienten Mäusen früher wieder zu einer Rekanalisierung kam, da die Thromben weniger stabil waren (siehe **Abbildung 5A**). Folglich war die Dauer des vollständigen arteriellen Gefäßverschlusses bei Eosinophilen-defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant kürzer. Hieraus lässt sich also schließen, dass eosinophile Granulozyten die Thrombusstabilität bei arterieller Thrombose im Rahmen der Atherosklerose erhöhen.

Als nächstes wurde analysiert, wie eosinophile Granulozyten bei arterieller Thrombose rekrutiert und aktiviert werden. Um die Dynamik der Rekrutierung bei arterieller Thrombose zu untersuchen, wurde die Thrombusbildung in *EoCre;PC-G5-tdTfl/fl* Mäusen mittels intravitaler Mikroskopie visualisiert. In diesem Mausmodell exprimieren eosinophile Granulozyten neben einem konstitutiv aktiven tdTomato-Signal auch den Kalziumindikator GCaMP5, der bei Kalziumbindung ein GFP-Signal emittiert. Bei diesen Experimenten zeigte sich, dass eosinophile Granulozyten innerhalb weniger Minuten nach der Applikation von FeCl₃ an der Gefäßwand anhaften. Da die Adhäsion von eosinophilen Granulozyten bei Inflammation abhängig von Integrinen ist, charakterisierten wir, ob eosinophile Granulozyten nur passiv im Thrombus hängen bleiben oder aktiv rekrutiert wurden (Jia et al., 1999; Schleimer et al., 1992). Eosinophile waren im Vergleich zum systemischen Blut in arteriellen Thromben deutlich angereichert, was gegen einen passiven Prozess spricht. Darüber hinaus fanden wir bei der Untersuchung der Thrombose in *EoCre;Kindlin-3fl/fl* Mäusen, bei denen eosinophilen Granulozyten das pan-integrin-Regulierungsprotein Kindlin-3 fehlt, deutlich kürzere Verschlusszeiten der Gefäße und die Bildung von okklusiven Thromben war stark beeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass Integrine für die lokale Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen bei arterieller Thrombose unerlässlich sind. Da gezeigt wurde, dass Thrombozyten eosinophilen Granulozyten im Rahmen allergischer

Reaktionen aktivieren, haben wir untersucht, ob Thrombozyten direkt mit eosinophile Granulozyten *in vivo* interagieren und diese aktivieren (Chihara et al., 1994; Kameyoshi et al., 1992). Tatsächlich fanden wir häufige Interaktionen zwischen Thrombozyten und Eosinophilen während der Thrombusbildung *in vivo*: Eosinophile Granulozyten dienten hier als Nidus für die Thrombenbildung, indem sie die Thrombozyten um sich herum bündelten. Diese Kontakte reichten von kurzfristigen bis hin zu permanenten Kontakten von eosinophilen Granulozyten und Thrombozyten. Die Thrombozyten-Eosinophilen Interaktionen hatten auch funktionelle Auswirkungen, was zu einer deutlich erhöhten Kalziumaktivität in eosinophilen Granulozyten von *EoCre;PC-G5-tdTfl/fl* Mäusen *in vivo* führte: Eosinophile, die im Blutkreislauf zirkulierten, zeigten starke intrazelluläre Kalziumanstiege, wenn sie auf Thrombozytenaggregate trafen. Während der Adhäsion an die Gefäßwand entwickelten eosinophile Granulozyten einen steilen Anstieg des Kalziumsignals, der nach Kontakt mit Thrombozyten deutlich zunahm. Aktivierte Eosinophile wiederum konnten *in vitro* die Aggregation von Thrombozyten induzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass eosinophile Granulozyten nach einer Endothelverletzung integrinabhängig an die Stelle der Thrombusbildung rekrutiert werden, wobei die Interaktion mit Thrombozyten zu einer gegenseitigen Aktivierung führt.

Als nächstes definierten wir die Kommunikationssignale der Thrombozyten-abhängigen Aktivierung eosinophiler Granulozyten *in vitro*. Hierzu wurde die IL-5 Sekretion der eosinophilen Granulozyten bestimmt, welches ihre Rekrutierung und Aktivierung auf autokrine Weise vermittelt (Dubucquoi et al., 1994). Thrombin-aktivierte Thrombozyten, aber nicht der zellfreie Überstand der aktivierten Thrombozyten induzierte die IL-5 Sekretion durch eosinophile Granulozyten. Neben der Freisetzung von IL-5 bilden aktivierte Eosinophile extrazelluläre DNA-Strukturen, die als *eosinophil extracellular traps* (EETs) bezeichnet werden - die eosinophilen Gegenstücke zu *neutrophil extracellular traps* (NETs) (Yousefi et al., 2008; Yousefi et al., 2012). NETs tragen zur Thrombusbildung bei, indem sie den intrinsischen Gerinnungsweg und Thrombozyten aktivieren (Fuchs et al., 2010; Martinod and Wagner, 2014; von Bruhl et al., 2012). Bei der Analyse muriner arterieller Thromben waren EETs nachweisbar, die sich von NETs durch die Präsenz des Granulaproteins MBP auf extrazellulärer DNA unterscheiden. Darüber hinaus stellen EETs mit 27% einen wesentlichen Anteil der extracellular traps dar. Das Vorhandensein von EETs wurde auch bei menschlichen Thromben aus Koronararterien bestätigt (siehe **Abbildung 5B**). Um den Auslöser für die EET-Bildung zu bestimmen, wurden isolierte eosinophile Granulozyten mit Thrombozyten koinkubiert und die EET-Bildung quantifiziert. Tatsächlich bildeten Eosinophile EETs nach Kontakt mit aktivierten Thrombozyten, aber nicht nach Inkubation mit ihrem Überstand oder mit ruhenden Thrombozyten. Dies deutet darauf hin, dass direkte Thrombozyten-Eosinophilen Kontakte für die Aktivierung eosinophiler Granulozyten unerlässlich sind. Um dies zu testen, wurde diese Interaktion mit einem anti-P-Selektin-Antikörper inhibiert, was zu einer reduzierten EET-Bildung führte. Darüber hinaus wurde auch die Wirkung der Blockade von CCL5 untersucht, einem Eosinophilen-aktivierenden Chemokin, das durch aktivierte Thrombozyten freigesetzt wird (Kameyoshi et al., 1992). Dies hatte aber keinen Einfluss auf die EET-Bildung.

Kürzlich wurden Antikörper gegen den hemmenden eosinophilen Rezeptor Siglec-8 und das murine Homolog Siglec-F als potente und selektive Inhibitoren der eosinophilen Granulozyten identifiziert. Dieser Mechanismus wird für therapeutische Interventionen bei Eosinophilen-vermittelten Krankheiten verwendet (Bochner, 2009; Kiwamoto et al., 2012). Tatsächlich beeinträchtigte die Therapie mit einem anti-Siglec-8 Antikörper die EET-Bildung. Somit werden eosinophile Granulozyten durch direkten Kontakt mit Thrombozyten aktiviert, welche die EET-Bildung auslösen.

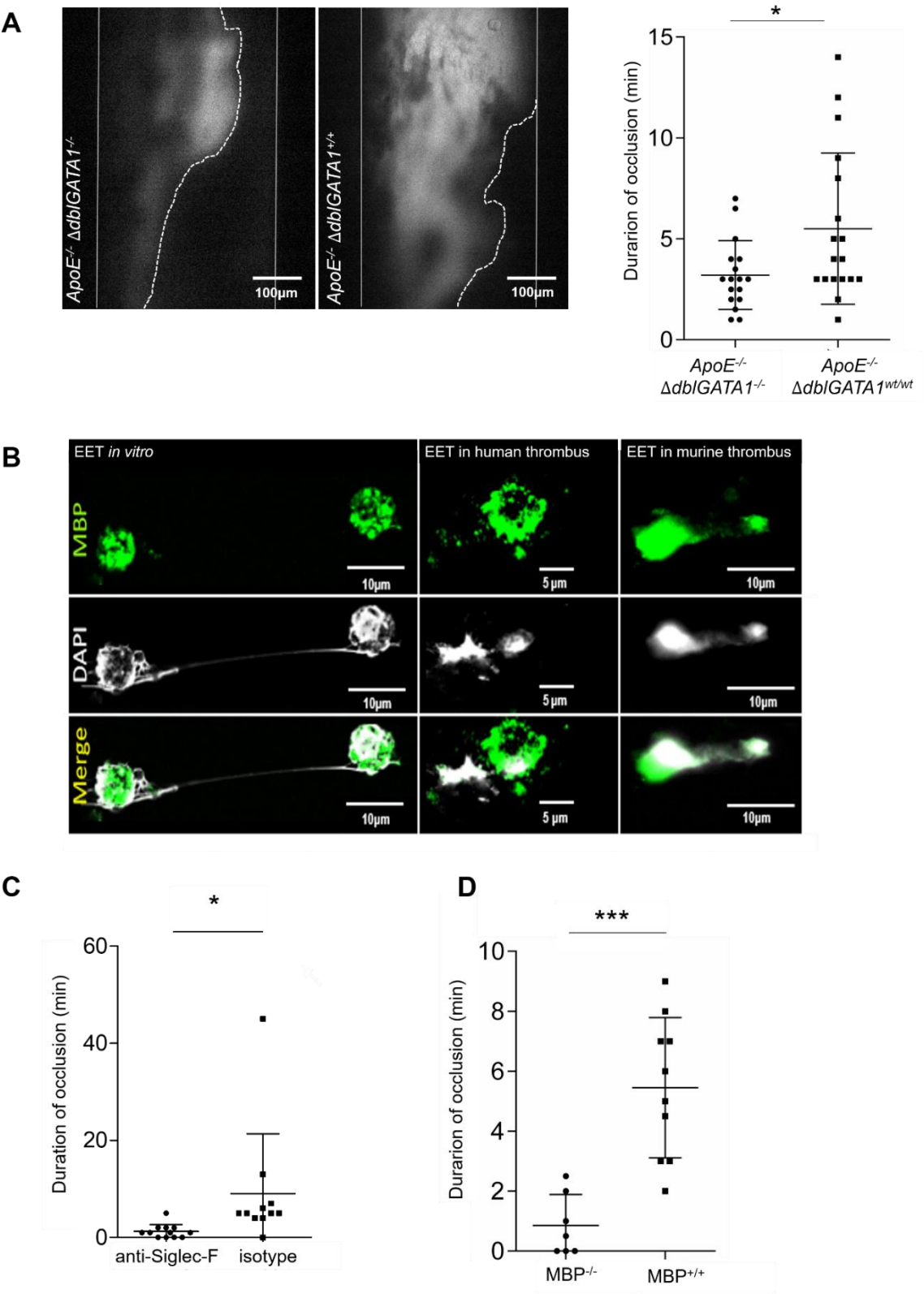


Abbildung 5: Eosinophile Granulozyten fördern die arterielle Thrombose durch Bildung von eosinophil extracellular traps

A) Links: Repräsentative Bilder der Thrombozytenakkumulation (grau, gestrichelte Linie) in der A. carotis (durchgezogene Linien) nach Applikation von FeCl_3 aus intravitraler Mikroskopie in $\text{ApoE}^{-/-};\Delta\text{dblGATA1}^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu $\text{ApoE}^{-/-};\Delta\text{dblGATA1}^{+/+}$ Geschwistertieren nach 13 Wochen HFD. Maßstab 100 μm . Rechts: Quantifizierung der Verschlusszeiten der A. carotis. **B)** Repräsentative Bilder der Bildung von eosinophil extracellular traps (EETs) bestehend aus DNA (weiß) und bedeckt mit dem Granulaprotein major basic protein (MBP, grün) *in vitro* sowie in humanen Koronarthromben und in murinen arteriellen Thromben *in vivo*. **C)** Verschlusszeit der A. carotis nach FeCl_3 Applikation in anti-Siglec-F und Isotyp behandelten C57Bl6 Tieren. **D)** Verschlusszeit der A. carotis nach FeCl_3 Applikation in $\text{MBP}^{-/-}$ und $\text{MBP}^{+/+}$ Geschwistertieren.

Nachdem hier gezeigt werden konnte, dass die EET-Bildung durch Thrombozyten induziert wird, wurde die Bedeutung von EETs für die arterielle Thrombose untersucht. Dazu haben wir getestet, ob die durch Siglec-F vermittelte direkte Hemmung von eosinophilen Granulozyten ein neuartiger Therapieansatz sein könnte. Tatsächlich zeigten Mäuse, die 20 Minuten vor der Thrombose mit dem Siglec-F-Antikörper behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant reduzierte Thrombusstabilität (siehe **Abbildung 5C**). Da der Siglec-F-Antikörper eine langfristig depletierende Wirkung auf Eosinophile hat, wurde untersucht, ob dieser kurzfristige Effekt in erster Linie auf die Depletion der eosinophilen Granulozyten oder deren Inaktivierung zurückzuführen ist. Wir konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl eosinophiler Granulozyten systemisch im Blut oder lokal in den Thromben zwischen Siglec-F-Antikörper oder Isotyp feststellen. Entsprechend der *in vitro* Befunde konnten wir jedoch eine deutlich reduzierte EET-Bildung bei Mäusen feststellen, die mit dem Anti-Siglec-F-Antikörper behandelt wurden. Daher könnte die gezielte Hemmung der EET-Bildung ein neuer Ansatz zur Prävention der arteriellen Thrombose sein.

Schließlich versuchten wir zu ermitteln, wie EETs zur Entwicklung der arteriellen Thrombose beitragen. Frühere Studien zeigten, dass die eosinophilen zytotoxischen Proteine major basic protein (MBP) und eosinophil peroxidase (EPX) Thrombozyten *in vitro* aktivieren können (Rohrbach et al., 1990). Auf EETs konnte mittels konfokaler Mikroskopie eine Co-Lokalisation von Thrombozyten und MBP nachgewiesen werden. Daher wurde die *in vivo* Relevanz von MBP und EPX bei arterieller Thrombose mit MBP- ($\text{MBP}^{-/-}$) und EPX-defizienten Mäusen ($\text{EPX}^{-/-}$) im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren untersucht. Dabei zeigten $\text{MBP}^{-/-}$ Tiere eine deutlich verringerte Thrombusstabilität mit verkürzter Dauer des vollständigen Gefäßverschlusses (siehe **Abbildung 5D**). Im Gegensatz dazu hatte das andere zytotoxische Protein EPX in diesem Modell der arteriellen Thrombose keinen Einfluss. Um die thrombusstabilisierende Wirkung von MBP weiter zu bestimmen, wurden eosinophile Granulozyten im Vollblut von $\text{MBP}^{-/-}$ Mäusen mit IL-5 und CCL11 aktiviert, gefolgt von einer ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. Interessanterweise zeigten Thrombozyten im Vollblut von $\text{MBP}^{-/-}$ Mäusen eine signifikant geringere Aggregation, was darauf hindeutet, dass MBP die Aktivierung der Thrombozyten verstärkt und die Thrombusbildung fördert.

Um festzustellen, ob bestimmte Patientenpopulationen unterschiedliche Eosinophilen-Zahlen aufweisen, wurden humane Koronarthromben systematisch auf das Vorhandensein von eosinophilen Granulozyten untersucht. Dazu wurde die Anzahl an eosinophilen Granulozyten in Thromben nach der Genese der Thrombose (akuter Myokardinfarkt in Nativgefäß (AMI) oder Stentthrombose (ST)), Geschlecht, kardiovaskuläre Risikofaktoren und klinische Präsentation verglichen. Hierbei wurden eosinophile Granulozyten durch die Eosinophilen-spezifische Luna-Färbung in allen Thromben nachgewiesen. Es gab keinen Unterschied in den Eosinophilen-Zahlen zwischen der AMI- und ST-Gruppe. Die logistische Regressionsanalyse von Thromben ergab jedoch eine signifikant erhöhte Anzahl von Eosinophilen in Thromben von weiblichen Patienten mit einer ST. Es gab keine Assoziation von Eosinophilen mit kardiovaskulären Risikofaktoren. Darüber hinaus hatte die klinische Präsentation mit einem ST-Hebungsinfarkt oder einem nicht-ST-Hebungsinfarkt keinen Einfluss auf die Anzahl der eosinophilen Granulozyten in menschlichen Koronarthromben. In der Untergruppe der Patientinnen mit Stent-Thrombose wurde kein Einfluss von kardiovaskulären Risikofaktoren auf die Anzahl eosinophiler Granulozyten festgestellt. Daher könnte der Beitrag von Eosinophilen zur Thrombose vom Geschlecht abhängen, da weibliche Patienten mit Stent-Thrombose die höchste Anzahl von Eosinophilen in Koronarthromben aufwiesen.

Zusammenfassend weisen klinische Beobachtungen darauf hin, dass Eosinophile an der atherosklerotischen Plaquebildung und arteriellen Thrombose beteiligt sind; die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch unvollständig verstanden (Avramakis et al., 2007; Gudbjartsson et al., 2009; Jiang et al., 2015; Riegger et al., 2016; Uderhardt et al., 2017). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Eosinophile im Rahmen der Atherosklerose aktiviert werden und die Plaquebildung fördern, indem sie die vWF-Exposition am Endothel induzieren, wodurch die Thrombozytenadhäsion und die Rekrutierung von Immunzellen in die Gefäßwand verstärkt wird. Nach Auslösung der arteriellen Thrombose werden eosinophile Granulozyten rasch und integrinabhängig an die Läsionsstelle rekrutiert und interagieren intensiv mit Thrombozyten, was zu einer Stabilisierung der sich entwickelnden Thromben führt. Umgekehrt hat dies die Aktivierung der eosinophilen Granulozyten zur Folge, wie mittels Echtzeit-Calcium-Bildgebung *in vivo* gezeigt werden konnte. Thrombozyten stimulieren Eosinophile zur Bildung von EETs, was wiederum die Aktivierung der Thrombozyten durch das Granulatprotein MBP bewirkt, welches die Oberfläche dieser DNA-Strukturen bedeckt. Die gezielte Inhibition der EET-Bildung *in vivo* erwies sich als neuer präventiver Ansatz für die arterielle Thrombose. Aus klinischer Sicht könnte dies besonders relevant für die Untergruppen von Patientinnen mit koronarer Stentthrombose sein, die in unserem prospektiven Register für Patienten mit Myokardinfarkt identifiziert wurden. Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass eosinophile Granulozyten zur Atherosklerose und arteriellen Thrombose durch eine intensive Interaktion mit Thrombozyten beitragen.

d. Das Zusammenspiel von Thrombozyten und myeloiden Leukozyten bei venöser Thrombose

Obwohl die venöse Thrombose durch einen anderen Stimulus als Zellnekrose – nämlich Verlangsamung des venösen Blutflusses – ausgelöst wird, teilt sie doch viele pathophysiologische Grundlagen mit der sterilen Inflammation (von Bruhl et al., 2012). Hier hat die Rekrutierung von Immunzellen nicht die Phagozytose nekrotischen Materials zur Folge, sondern die Aktivierung der Blutgerinnung, was letztlich zur Thrombusbildung führt. Diese Prozesse konnten an einem durch unsere Arbeitsgruppe entwickelten Mausmodell der venösen Thrombose untersucht werden, welches der Pathophysiologie beim Menschen sehr nahe kommt: Durch eine Verengung der V. cava inferior bei der Maus wird dort eine Flussverlangsamung erzielt, was über 48 Stunden zur Thrombusbildung führt, ohne dass es zur Nekrose der Gefäßwand oder intraluminaler Zellen kommt, was mittel histologischer Färbungen und elektronenmikroskopischer Aufnahmen belegt werden konnte (Brandt et al., 2014) (siehe **Abbildung 6A**). Die entstehenden Thromben weisen die charakteristische Schichtung in einen weißen sowie einen roten Thrombus auf. Bereits wenige Stunden nach der Flussverlangsamung kommt es zur Rekrutierung von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten an das Endothel, welches innerhalb von sechs Stunden vollständig durch diese Zellen bedeckt ist (siehe **Abbildung 6B, C**). Die Ansammlung dieser myeloiden Leukozytenpopulationen wird durch das Adhäsionsmolekül P-Selectin vermittelt, welches zusammen mit vWF aus den intrazellulären Weibel-Palade Körperchen des Endothels an die Zelloberfläche mobilisiert wird. Dadurch kann endotheliales P-Selectin mit PSGL-1 auf den Leukozyten interagieren und so deren Rekrutierung zum Endothel vermitteln. Auch Thrombozyten verfügen über P-Selectin, doch ist dies nicht an der Leukozytenrekrutierung beteiligt. In P-Selectin-defizienten Tieren war jedoch nicht nur die Ansammlung von Leukozyten beeinträchtigt, diese Tiere waren auch vor Thrombose geschützt (siehe **Abbildung 7A**). Diese Daten deuten darauf hin, dass erst die Entzündungsreaktion mit der Rekrutierung myeloider Leukozyten eine Aktivierung der Blutgerinnung auslöst.

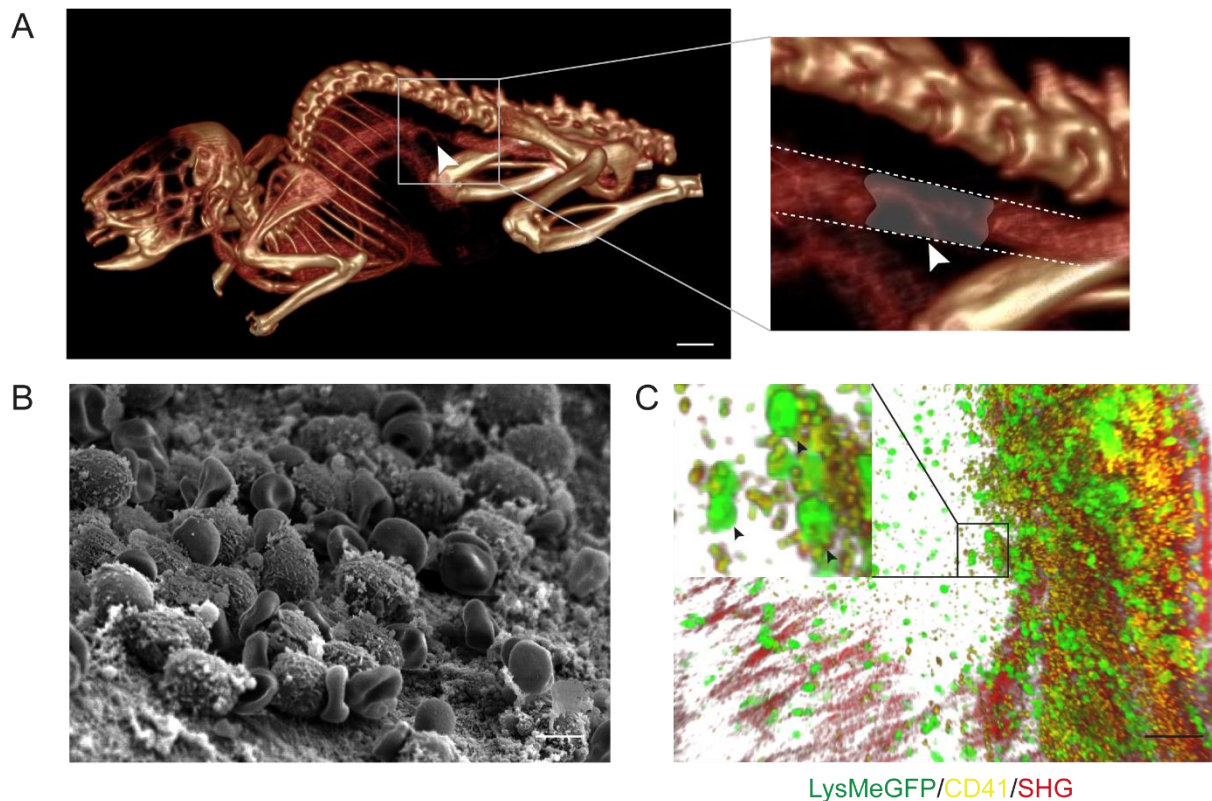


Abbildung 6: Mausmodell der venösen Thrombose durch Flussverlangsamung in der V. cava inferior

A) Links: 3D-Rekonstruktion einer Computertomographie der Maus nach Kontrastmittelaapplikation zeigt eine Kontrastmittelaussparung in der V. cava inferior (Pfeil) 48 Stunden nach Flussverlangsamung. Rechts: Vergrößerung der V. cava inferior (gestrichelte Linie) mit Thrombusbildung (Pfeil). **B)** Elektronenmikroskopische Aufnahme der Endotheloberfläche der V. cava inferior sechs Stunden nach Flussverlangsamung. Das Endothel ist mit Fibrin, Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten bedeckt. Maßstab 5 µm. **C)** 3D-Rekonstruktion aus intravitaler 2-Photonenmikroskopie der V. cava inferior sechs Stunden nach Flussreduktion. Die Gefäßwand (rot, second harmonic generation) ist mit Thrombozyten (gelb) und myeloiden Leukozyten (grün) bedeckt. Links oben: Vergrößerung von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten (Pfeile). Maßstab 50 µm.

Daher untersuchten wir nun im Detail, wie myeloide Leukozyten die Gerinnungskaskade in Gang setzen können. Eine wichtige Bedeutung kommt hierbei tissue factor (TF, oder auch Gewebefaktor) zu, welcher durch Bindung an Faktor VII den extrinsischen Weg der Blutgerinnung aktiviert. TF ist im Wesentlichen außerhalb des Endothels in der Gefäßwand sowie im umgebenden Gewebe zu finden, doch ist er auch auf Monozyten und eosinophilen Granulozyten im Blut in seiner inaktiven Form nachweisbar. Erst nach Aktivierung der Monozyten kann TF auf deren Oberfläche seine prokoagulatorische Wirkung entfalten. Um die Rolle von TF bei venöser Thrombose zu untersuchen, verwendeten wir *low-hTF* Mäuse, die nur minimale Mengen humanen TF exprimieren, aber keinen murinen TF. Diese Tiere entwickelten keine Thromben, was die Schlüsselrolle des extrinsischen Wegs der Blutgerinnung unterstreicht. Um weiter zu differenzieren, ob TF aus der Gefäßwand oder aus dem Blut für die Entstehung der venösen Thrombose entscheidend ist, verwendeten wir Knochenmarkchimären, bei denen *low-hTF* Tiere als Spendertiere zum Einsatz kamen. Dadurch konnte selektiv die Rolle des TF im Blut analysiert werden und es zeigte sich, dass diese Tiere ebenfalls vor Thrombusbildung geschützt sind und damit TF von Blutzellen und nicht aus der Gefäßwand hier die entscheidende Bedeutung

zukommt. Durch *LysMCre;Tffl/fl* Tiere konnten wir zeigen, dass TF vor allem aus myeloiden Leukozyten und insbesondere Monozyten zur Thrombusbildung beiträgt.

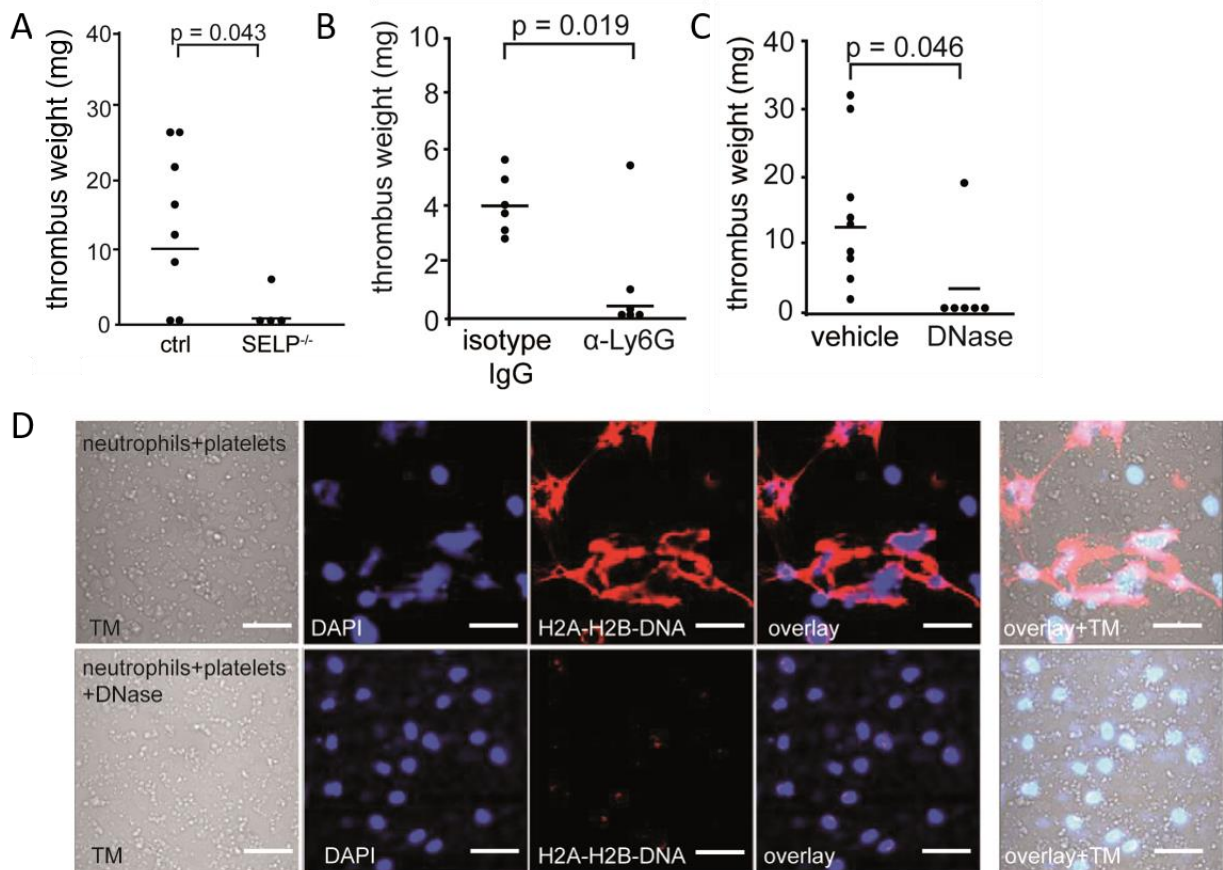


Abbildung 7: Rekrutierung myeloider Leukozyten und Thrombozyten induzierte Bildung von neutrophil extracellular traps als Schlüsselfaktoren der Thrombose

Thrombusgewicht der V. cava inferior nach Flussverlangsamung in: **A)** *Selp^{-/-}* Mäusen mit Defizienz von P-Selectin; **B)** Wildtyp Mäusen und Depletion von neutrophilen Granulozyten mittels eines Ly6G Antikörpers; **C)** Wildtypmäusen nach Gabe von DNase zur Auflösung von NETs. **C)** Obere Reihe: Induktion von NETs durch aktivierte Thrombozyten *in vitro*. Untere Reihe: Auflösung der NETs durch Applikation von DNase. DNA in blau (DAPI), Histon H2A-H2B in rot. Maßstab 20 μ m.

Neben Monozyten werden insbesondere neutrophile Granulozyten nach Flussverlangsamung in der V. cava rasch an das Endothel rekrutiert. Um ihre Bedeutung für die Thrombusbildung zu evaluieren, depletierten wir diese Zellpopulation, was eine signifikant verminderte Thrombose zur Folge hatte (siehe **Abbildung 7B**). Ein Mechanismus, wie neutrophile Granulozyten zur Aktivierung der Blutgerinnung *in vitro* beitragen können, ist durch die Ausbildung von NETs, also die Freisetzung nukleärer DNA, die mit Granulaproteinen dekoriert ist. Tatsächlich waren NETs innerhalb von drei Stunden nach Initiierung der Thrombose *in vivo* in großer Anzahl nachweisbar und enthielten die charakteristischen Komponenten DNA, Histone, neutrophile Elastase und Myeloperoxidase. Zudem waren sie von einem dichten Fibrinnetzwerk umgeben und zahlreiche Thrombozyten adhärten an den NETs. Um die prothrombotische Wirkung der NETs zu überprüfen, wurden Mäuse mit DNase1 behandelt, was die NETs auflöste und die Thrombusbildung signifikant verringerte (siehe **Abbildung 7C**). Zudem reduzierte die Gabe von Heparin die Bildung von NETs, was zum antithrombotischen Effekt dieser Antikoagulanzen

beitragen könnte. Somit leisten neutrophile Granulozyten durch die Ausbildung von NETs einen wichtigen Beitrag zur venösen Thrombose (Pfeiler et al., 2016).

Neben myeloiden Leukozyten kam es auch zur progredienten Akkumulation von Thrombozyten, die entweder direkt an das Endothel adhärten oder heterotypische Aggregate mit myeloiden Leukozyten bildeten, was mittels intravitaler 2-Photonen Mikroskopie gezeigt werden konnte. Diese Interaktion war abhängig von thrombozytärem Glycoprotein Iba (GPIba), da in GPIba-defizienten Tieren keine Kontakte mit Leukozyten mehr nachweisbar waren. Zudem wiesen diese Tiere nicht nur eine signifikant verminderte Thrombozytenrekrutierung auf – da GPIba der Rezeptor für vWF ist – sondern auch eine signifikant verminderte Akkumulation von myeloiden Leukozyten, was zusammen die Thrombusbildung verhinderte. Dieser Mechanismus ist auch an der Ausbildung von Kollateralen beteiligt (Chandraratne et al., 2015). Um die funktionelle Bedeutung der Thrombozyten-Leukozyten Interaktion zu charakterisieren, inkubierten wir beide zusammen, was im Falle von aktivierten Thrombozyten die Freisetzung von NETs aus den neutrophilen Granulozyten auslöste (siehe **Abbildung 7D**). Auch im Kontext der bakteriellen Infektion ist dies von Bedeutung, wobei migrierende Thrombozyten Bakterien an ihrer Oberfläche ansammeln und neutrophilen Granulozyten präsentieren (Gaertner et al., 2017). Zusammenfassend unterstützen Thrombozyten also die Rekrutierung von myeloiden Leukozyten und stimulieren die NET-Bildung durch neutrophile Granulozyten in der venösen Thrombose. Schließlich wollten wir analysieren, wie NETs zur Thrombusbildung beitragen. Da negativ geladene Oberflächen Faktor XII (FXII) und damit den intrinsischen Weg der Blutgerinnung aktivieren, überprüften wir ob, dies auch durch NETs ausgelöst werden kann - durch ihr DNA-Gerüst haben sie eine negative Ladung. *In vitro* zeigte sich, dass die durch Thrombozyten ausgelöste NET Bildung eine Aktivierung von FXII zur Folge hatte, was durch Zerstörung der NETs verhindert werden konnte. *In vivo* führte eine pharmakologische Inhibition von FXII oder die Verwendung von FXII-defizienten Tieren zu einer signifikanten Beeinträchtigung der venösen Thrombose.

Bei venöser Thrombose verursacht somit die Flussverlangsamung eine sterile Inflammation: Durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten wird die Gerinnungskaskade aktiviert, was letztlich im Gefäßverschluss mündet. In diesem Zusammenhang konnten kürzlich auch Erythrozyten und eosinophile Granulozyten als beteiligte zelluläre Faktoren identifiziert werden (Klatt et al., 2018; Uderhardt et al., 2017). Dabei kommt Thrombozyten eine Schlüsselrolle zu, da sie intensiv mit Monozyten und neutrophilen Granulozyten interagieren und diese zur Stelle der Thrombusbildung rekrutieren. Thrombozyten sind jedoch auch von entscheidender Bedeutung bei physiologischen Gefäßverschlüssen wie dem postnatalen Verschluss des Ductus arteriosus (Echtler et al., 2010).

In der venösen Thrombose liefern Monozyten TF zum Ort der Flussverlangsamung und initiieren dadurch die Aktivierung des extrinsischen Wegs der Blutgerinnung. Die aktivierten Thrombozyten lösen die Bildung von NETs aus, welche bei venöser Thrombose entscheidend für die Propagierung der Gerinnselbildung sind und eine wichtige Schnittstelle zwischen Inflammation

und Thrombose darstellen: Zum einen führt extrazelluläre DNA – als negativ geladene Struktur – zur Aktivierung des intrinsischen Wegs der Gerinnungskaskade; zum anderen vermitteln NETs die Adhäsion von Thrombozyten und führen zur weiteren Aktivierung der Thrombozyten im Sinne einer positiven Rückkopplung. Sowohl die Rekrutierung der Monozyten als auch die NETosis werden dabei durch HMGB1 vermittelt, das aus Thrombozyten freigesetzt wird.

e. HMGB1 als Mediator der sterilen Inflammation bei venöser Thrombose

HMGB1 ist ein prototypischer Mediator der sterilen Inflammation, weshalb wir untersuchten, ob dieser Mediator auch bei venöser Thrombose eine Rolle spielt. HMGB1 ist ein DNA-bindendes Protein, das bei Nekrose aus dem Zellkern freigesetzt wird, aber auch von aktivierten Immunzellen aktiv sezerniert werden kann. Zudem ist es in Thrombozyten enthalten und wird bei deren Stimulation freigesetzt. HMGB1 war in venösen Thromben bereits eine Stunde nach der Flussverlangsamung nachweisbar. Die pharmakologische Inhibition von HMGB1 durch BoxA reduzierte die venöse Thrombusbildung signifikant, was die funktionelle Relevanz dieses Proteins aufzeigt. Da nur sehr wenige nekrotische Zellen in der Gefäßwand sowie im Lumen der V. cava vorzufinden waren, was mittels intravitaler Propidium Iodid Färbung analysiert wurde, versuchten wir, die Quelle von HMGB1 bei venöser Thrombose zu identifizieren: HMGB1 war zum einen mit NETs und zum anderen mit Thrombozyten assoziiert. Um die funktionelle Bedeutung von HMGB1 aus Blutzellen zu bestimmen, generierten wir Chimären mit Hmgb1^{-/-} oder Hmgb1^{+/+} fetalen Leberzellen, wobei das Fehlen von HMGB1 in Blutzellen die Thrombusbildung signifikant verringerte (Stark et al., 2016) (siehe **Abbildung 8A**). Da Thrombozyten oder neutrophile Granulozyten als Quelle von HMGB1 in Frage kommen, reinfundierten wir Hmgb1^{-/-} oder Hmgb1^{+/+} Thrombozyten und neutrophile Granulozyten in Hmgb1^{-/-} Chimären, wobei nur Hmgb1^{+/+} Thrombozyten in der Lage waren, die Thrombusbildung wiederherzustellen. Somit konnten wir zeigen, dass HMGB1 zur venösen Thrombose beiträgt und hauptsächlich aus Thrombozyten freigesetzt wird.

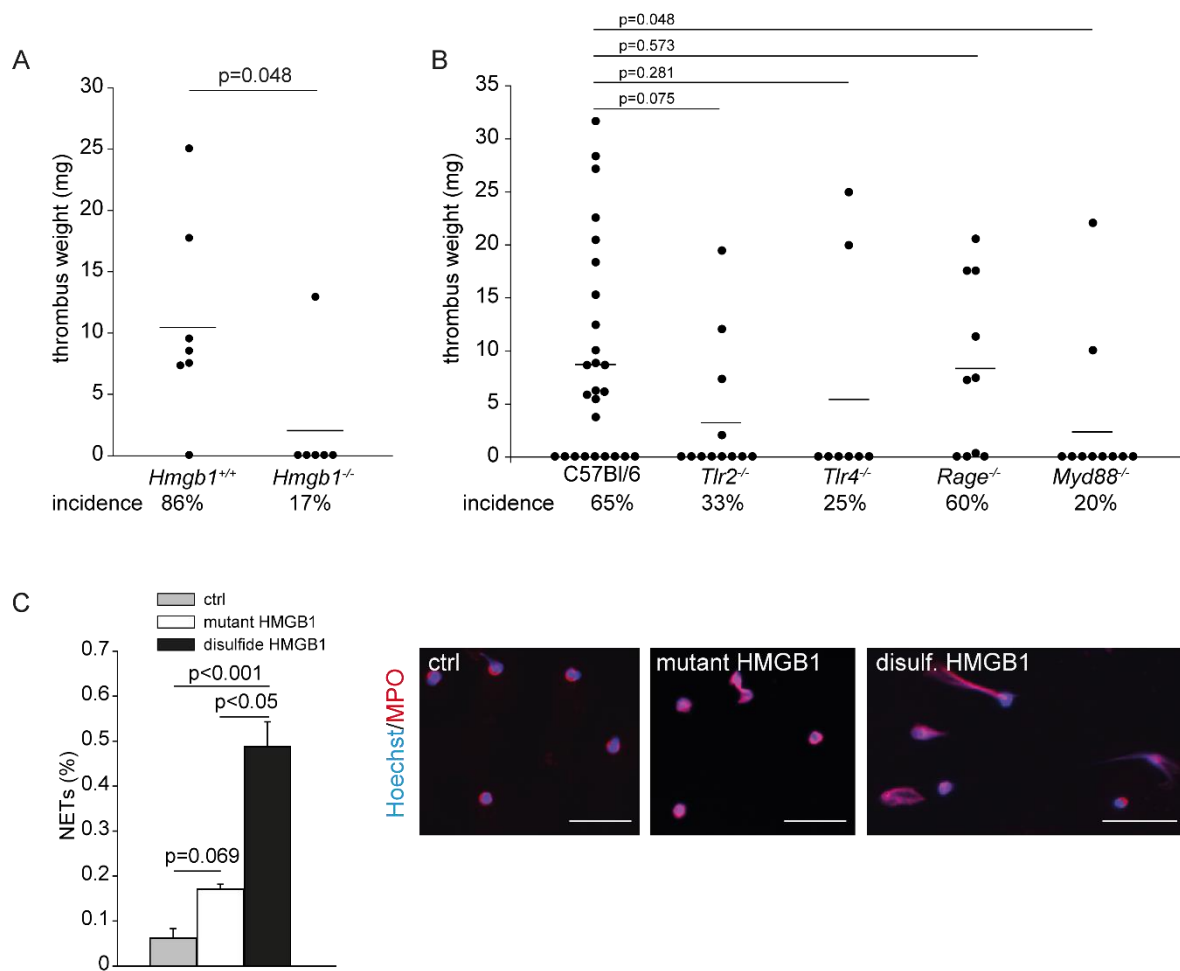


Abbildung 8: HMGB1 als Mediator der sterilen Entzündungsreaktion bei venöser Thrombose

Thrombusgewicht der V. cava inferior nach 48 Stunden Flussverlangsamung in: **A)** $Hmgb1^{-/-}$ und $Hmgb1^{+/+}$ fetalen Leberzellchimären; **B)** C57Bl/6 Mäusen sowie $Tlr2^{-/-}$, $Tlr4^{-/-}$, $Rage^{-/-}$ und $Myd88^{-/-}$ Tieren; **C)** Links: Quantifizierung der Bildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) nach Inkubation mit unterschiedlichen HMGB1 Redoxformen *in vitro*. Rechts: Repräsentative Bilder der NETosis gefärbt mit Hoechst (blau) und Myeloperoxidase (MPO/rot). Maßstab 50µm.

Die biologischen Effekte von HMGB1 werden durch unterschiedliche Rezeptoren vermittelt, insbesondere TLR2, TLR4 und RAGE. Daher untersuchten wir an Mäusen mit genetischen Defizienzen dieser Rezeptoren, welcher von ihnen den prothrombotischen Effekt von HMGB1 vermittelt. Zwar verringerte der knockout von TLR2, TLR4 und RAGE die Thrombusbildung, doch konnte hier kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Da diese Rezeptoren alle auf ihrem intrazellulären Signalweg auf das Adapterprotein MYD88 angewiesen sind, überprüften wir ob, eine Defizienz dieses Signalmoleküls – und eine damit eingeschränkte intrazelluläre Signalweiterleitung von TLR2, TLR4 und RAGE – die Thrombusbildung beeinflusst und konnten hier eine signifikant verminderte Thrombusbildung nachweisen (siehe **Abbildung 8B**). Dies deutet darauf hin, dass diese Rezeptoren redundante Funktionen haben bei der Vermittlung des prothrombotischen Effekts von HMGB1. Im nächsten Schritt charakterisierten wir, wie HMGB1 das Zusammenspiel von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten beeinflusst. Zwar hatte die pharmakologische Inhibition von HMGB1 sowie das Fehlen von HMGB1 in

Blutzellen keinen Einfluss auf die Akkumulation neutrophiler Granulozyten, doch war die Bildung von NETs signifikant reduziert, was über RAGE vermittelt wurde und abhängig von thrombozytärem HMGB1 war. Ebenso wurde die Rekrutierung der Monozyten dadurch gesteuert, was durch TLR2 und RAGE vermittelt wurde. Bei Thrombozyten zeigte sich lediglich ein geringer Effekt von HMGB1 auf deren Akkumulation im Thrombus, jedoch war die frühe Thrombozytenrekrutierung durch Inhibition von HMGB1 signifikant reduziert.

Da die biologische Aktivität von HMGB1 von der Redoxform abhängig ist, untersuchten wir, welche Oxidationsstufe von HMGB1 prothrombotisch wirkt. Während intrazelluläres HMGB1 in reduzierter Form vorliegt und vorwiegend chemotaktische Eigenschaften hat, wird es im extrazellulären Raum rasch oxidiert, wodurch es einen aktivierenden Effekt auf Leukozyten ausübt, aber den chemotaktischen Effekt verliert (Venereau et al., 2012; Venereau et al., 2013). In der venösen Thrombose zeigte sich, dass die thrombogenen Effekte durch oxidiertes disulfid HMGB1 vermittelt werden: Nur die Infusion dieser Redoxform in Tiere mit hämatopoietischer Defizienz von HMGB1 konnte die Thrombusbildung wiederherstellen, während eine nicht-oxidierbare Variante von HMGB1 keinen Effekt hatte. Auch *in vitro* war nur disulfid HMGB1 in der Lage, die NET-Bildung auszulösen, die tissue factor Expression in Monozyten zu induzieren sowie die Blutgerinnung zu aktivieren (siehe **Abbildung 8C**). Ebenso konnte ein aktivierender Effekt dieser Redoxform auf Thrombozyten nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der biologischen Aktivität der verschiedenen Redoxformen von HMGB1 auf ein unterschiedliches Bindungsverhalten an Rezeptoren zurückzuführen sind, charakterisierten wir das Bindungsverhalten der HMGB1-Redoxformen an RAGE mittels surface plasmon resonance. Dabei zeigte sich, dass es zwei Bindungsstellen für HMGB1 an RAGE gibt, wobei die erste eine ähnliche Kinetik für alle Redoxformen hat, die zweite Bindungsstelle jedoch deutliche Unterschiede je nach Redoxform aufweist. Dies könnte also die Unterschiede im prothrombotischen Effekt von HMGB1 erklären. Zusammenfassend konnten wir also zeigen, dass Thrombozyten bei venöser Thrombose HMGB1 freisetzen, welches zur Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten führt, die vermehrt TF produzieren und so die Blutgerinnung in Gang setzten. Zudem induziert HMGB1 die Bildung von NETs, welche mehr HMGB1 am Ort der Thrombusbildung zur Verfügung stellen. Dies wiederum aktiviert Thrombozyten auf auto-/parakrine Weise und initiiert so einen sich selbst verstärkenden Kreislauf aus Inflammation und Thrombose, der letztlich in der Bildung eines okkludierenden venösen Thrombus mündet. Somit ist HMGB1 ein attraktiver anti-inflammatorischer Ansatzpunkt zur Prävention der Thrombose, ohne dass hierdurch die Blutgerinnung beeinträchtigt wird.

f. Die thrombogenen Eigenschaften von Tumor Mikrovesikeln sind unabhängig vom Prozess der sterilen Inflammation in der venösen Thrombose

Nachdem in den vorherigen Publikationen gezeigt werden konnte, dass eine Entzündungsreaktion notwendig ist, um die Blutgerinnung bei venöser Thrombose zu aktivieren, untersuchten wir ob dies auch im Fall der Tumor-assoziierten Thrombose zutrifft. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass Patienten mit Tumorerkrankungen, und hier insbesondere mit Pankreaskarzinom, ein deutlich erhöhtes Risiko für venöse Thrombosen und Lungenembolien aufweisen (Cronin-Fenton et al., 2010; Timp et al., 2013). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt. Mikrovesikel, die aus Tumorzellen konstitutiv freigesetzt werden und *in vitro* eine starke Aktivierung der Blutgerinnung auslösen, sind jedoch potentielle Verursacher dieser erhöhten Thromboseneigung (Hisada et al., 2017; Owens and Mackman, 2011).

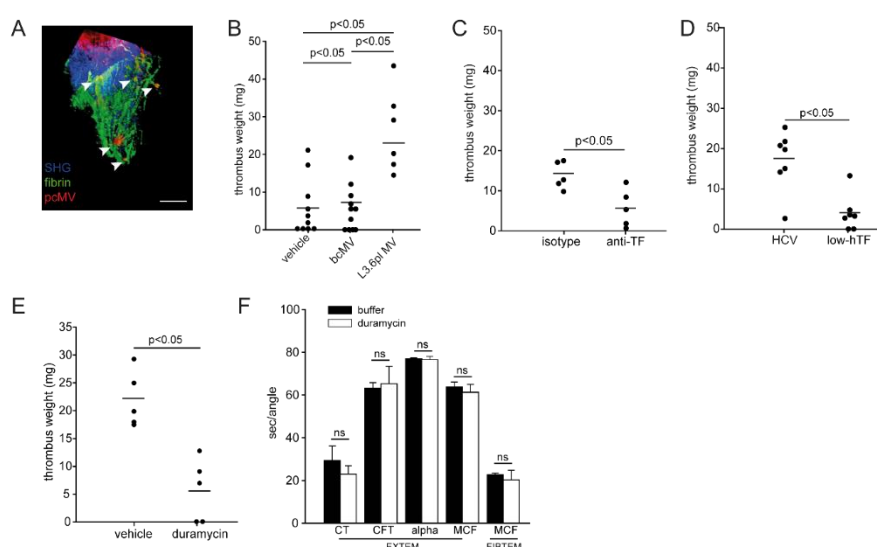


Abbildung 9: Pankreaskarzinom Mikropartikel verstärken die venöse Thrombose

A) 3D-Rekonstruktion aus intravitaler 2-Photonenmikroskopie der Gefäßwand der V. cava inferior nach Flussreduktion. An der Gefäßwand (second harmonic generation, blau) anhaftende Pankreaskarzinom Mikrovesikel (pcMV, rot) umgeben von Fibrin (grün). Maßstab 20 μ m. Pfeile zeigen auf pcMV, die sich im Fibrinnetz verfangen. Thrombusgewicht in der V. cava inferior 48 Stunden nach Flussverlangsamung in: **B)** C57Bl6 Tieren nach Injektion von PBS, Blutmikrovesikeln (bcMV) und Mikrovesikel der Pankreaskarzinom-Linie L3.6pl (L3.6pl MV); **C)** C57Bl6 Tieren nach Injektion von L3.6pl MV, die mit anti-tissue factor (TF) oder Isotyp Antikörper vorbehandelt wurden. **D)** Tieren mit niedriger Expression von TF (low-hTF) und entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (HCV) mit Injektion von L3.6pl MV. **E)** C57Bl6 Tieren nach Injektion von L3.6pl MV, die mit PBS oder Duramycin zur Blockade von Phosphatidylethanolamin vorbehandelt wurden. **F)** Effekt der systemischen Injektion von Duramycin auf die Blutgerinnung bestimmt mittels EXTEM- und FIBTEM-Test.

Um dies *in vivo* zu untersuchen, konnten wir ein Modell etablieren, bei dem wir die thrombogenen Effekte von Mikrovesikeln in der venösen Thrombose analysierten (Stark et al., 2018b). Dabei zeigte sich, dass Mikrovesikel aus einer Pankreaskarzinom-Zelllinie stark thrombogen wirken (Pfeiler et al., 2019). Diese lagern sich an das aktivierte Endothel bei Flussverlangsamung an und lösen dort eine überschießende Fibrinbildung aus (siehe **Abbildung 9A, B**). Dies ist abhängig von einem Zusammenspiel mit der physiologischen Blutgerinnung: Der extrinsische Weg der Blutgerinnung wird durch TF auf den Tumor Mikrovesikeln sowie dem Endothel synergistisch in Gang gesetzt, wie mit Hilfe von low-hTF Chimären gezeigt werden konnte (siehe **Abbildung 9C**,

D). Bei dieser Mauslinie wird kein muriner TF gebildet, jedoch geringe Mengen des humanen Äquivalents. Dabei induzieren Tumor Mikrovesikel die Bildung von TF durch Endothelzellen. Dahingegen spielen prokoagulatorische Effekte der intrinsischen Gerinnungskaskade sowie der myeloiden Leukozyten hier keine Rolle und auch NETs sind an der Thrombusbildung nicht beteiligt. Ebenso wenig tragen Thrombozyten zur Tumor Mikrovesikel-assoziierten Thrombose bei und anti-thrombozytäre Therapieansätze wie ASS erwiesen sich hier als unwirksam. Somit unterscheidet sich die Pathogenese der Tumor-assoziierten Thrombose deutlich von der lediglich durch Blutflussverlangsamung verursachten Thrombose. In dieser Arbeit konnten wir jedoch einen neuen Ansatz für die Prävention der Tumor-assoziierten Thrombose aufzeigen: Die prokoagulatorischen Eigenschaften der Tumor Mikrovesikel werden durch ihre oberflächliche Phospholipid-Zusammensetzung bestimmt. Eine Inhibition von Phosphatidylethanolamin durch Duramycin konnte die thrombogene Wirkung der Mikrovesikel verhindern, ohne die Blutgerinnung zu beeinträchtigen (siehe **Abbildung 9E, F**). Somit konnte in diesem Projekt gezeigt werden, dass die Tumor-assoziierte venöse Thrombose eine deutlich andere Pathophysiologie aufweist als die lediglich durch Verlangsamung des Blutflusses hervorgerufene Thrombose. Bei ersterer spielen inflammatorische Mechanismen eine untergeordnete Rolle, jedoch kann die thrombogene Wirkung von Tumor Mikrovesikeln durch Modifizierung ihrer Phospholipidkomposition inhibiert werden.

3. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Habilitationsarbeit konnte gezeigt werden, dass der Prozess der sterilen Inflammation einen neuen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt. Dabei konnten Perizyten als aktive Teilnehmer identifiziert werden, die einen wichtigen Beitrag zur Koordination der interstitiellen Entzündungsreaktion liefern. Sie fungieren als Navigationssystem vor Zellen des angeborenen Immunsystems im Gewebe und erlauben eine schnelle und effiziente Migration. Zudem limitieren Perizyten überschießende Gewebeschädigung durch Retention von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im perivaskulären Raum. Die Bedeutung dieses immunmodulatorischen Effekts von Gefäßwandzellen konnte auch im Rahmen der Atherosklerose gezeigt werden: Hier führt die Aktivierung von glatten Gefäßmuskelzellen zur deren Dedifferenzierung und zur vermehrten Freisetzung des Chemokins CCL2. Dieses Chemokin wird als wesentlicher Faktor der maladaptiven Immunreaktion bei Atherosklerose gesehen. In zwei Tiermodellen der spezifischen CCL2-Defizienz in glatten Gefäßmuskelzellen war jedoch ein atheroprotektiver Effekt nachweisbar, was einen Kompartiment-spezifischen Effekt von CCL2 impliziert. Diese Ergebnisse legen zusammenfassend nahe, dass eine generelle Inhibition von Chemokinen kein erfolgsversprechendes Konzept in der Behandlung der Atherosklerose ist, sondern dass eine zellspezifische Inhibition der atherogenen Effekte ein vielversprechenderer Therapieansatz wäre.

Als weiteren zellulären Faktor in der Atherosklerose konnten eosinophile Granulozyten identifiziert werden. Dieser Zelltyp wird vor allem mit Parasitenabwehr und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht, doch gibt es auch zahlreiche klinische Hinweise auf eine wichtige Bedeutung in kardiovaskulären Erkrankungen. Hier konnten wir nachweisen, dass das Zusammenspiel von Thrombozyten und eosinophilen Granulozyten sowohl die atherosklerotische Plaquebildung als auch die arterielle Thrombose fördert. Im Kontext der Atherosklerose werden eosinophile Granulozyten aktiviert und stimulieren das Endothel, was in einer verstärkten Exposition von vWF resultiert. Dadurch wird die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel induziert, was wiederum eine gesteigerte Rekrutierung von Immunzellen in den Plaque und damit auch ein vermehrtes Plaquewachstum bewirkt. Arterielle Thrombose ist eine häufige Konsequenz der Atherosklerose und auch hier zeigte sich, dass eosinophile Granulozyten diesen Prozess durch die Bildung von *extracellular traps* stabilisieren. Mittels innovativer *in vivo* Calcium Bildgebung konnte nachgewiesen werden, dass direkte Kontakte zwischen Thrombozyten und eosinophilen Granulozyten zu deren Aktivierung führen. Zudem wird die Bildung der EETs durch Thrombozyten stimuliert, welche wiederum das Granulaprotein MBP auf ihrer Oberfläche exponieren. MBP verstärkt die Aktivierung der Thrombozyten, wodurch der entstehende Thrombus stabilisiert wird. Die Bildung von EETs konnte auch in humanen Koronarthromben nachgewiesen werden - eine Hemmung der Aktivierung eosinophiler Granulozyten könnte deshalb eine vielversprechende Therapiemöglichkeit bei Atherosklerose und Thrombose sein.

Bei der venösen Thrombose durch Verlangsamung des Blutflusses ist ebenfalls eine Entzündungsreaktion unter Beteiligung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten Voraussetzung für die nachfolgende Aktivierung der Blutgerinnung und Thrombusbildung. Somit sind anti-inflammatorische Strategien ein innovativer Ansatz in der Prävention der Thrombose, ohne dass die Blutgerinnung dadurch kompromittiert wird. Auf molekularer Ebene konnte hier HMGB1 als molekularer Ansatzpunkt identifiziert werden, das aus Thrombozyten freigesetzt wird und über TLRs und RAGE die Aktivierung von Leukozyten auslöst. Unter anderem wird dadurch die Bildung von NETs induziert, deren Abbau durch DNase ebenfalls die Thrombusbildung inhibiert. Somit kommt Thrombozyten bei der venösen Thrombose eine Schlüsselrolle in der inflammatorischen Reaktion zu. Durch die Stimulation der Bildung von NETs durch neutrophile Granulozyten wird zudem eine Schnittstelle zwischen Inflammation und Thrombose erzeugt, welche die Thrombusbildung im Sinne eines *circulus vitiosus* weiter vorantreibt. Die Entwicklung spezifischer anti-inflammatorischer Therapeutika zur Prävention der Thrombose und deren klinische Anwendung bleibt eine Herausforderung für die Zukunft.

In einer weiteren Arbeit konnten wir zeigen, dass sich die Pathogenese der venösen Thrombose je nach auslösendem Risikofaktor deutlich unterscheidet. Patienten mit Krebserkrankungen haben ein deutlich erhöhtes Thromboserisiko, vor allem beim Pankreaskarzinom. Daher untersuchten wir, wie Mikrovesikel aus Pankreaskarzinomen die venöse Thrombusbildung beeinflussen und konnten zeigen, dass diese zu einer exzessiven Thrombusbildung führen.

Mechanistisch beruht die Tumor-assoziierte Thrombose auf einem Zusammenspiel aus Gerinnungsaktivierung durch Tumor Mikrovesikel und durch das Endothel. Inflammatorische Prozesse spielen in diesem Kontext nur eine untergeordnete Rolle. Jedoch konnten wir die Modulation der Phospholipidoberfläche der Tumor Mikrovesikel als neuen präventiven Ansatz identifizieren, welcher die thrombogenen Eigenschaften der Tumor Mikrovesikel neutralisiert und die Blutgerinnung nicht beeinträchtigt. Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, ob präventive Ansätze abhängig von Risikofaktoren eine erfolgsversprechende Strategie in der Behandlung der venösen Thrombose sind. Hierfür sind ein besseres Verständnis der Pathophysiologie sowie die Identifikation neuer Zielstrukturen notwendig.

Somit konnten in der vorliegenden Habilitationsschrift neue klinisch relevante Mechanismen der sterilen Inflammation identifiziert werden, die im Kontext der Thrombose und Atherosklerose neue therapeutische Optionen aufzeigen. In Zukunft wird es neben einer weiteren translationalen Zielrichtung auch von entscheidender Bedeutung sein, die Prozesse der sterilen Inflammation bei humaner Thrombose und Atherosklerose besser zu verstehen. Nur so kann eine Kompromittierung der Infektabwehr bei anti-inflammatorischen Therapien vermieden werden, die potenziell vorteilhafte Effekte neutralisieren würden.

4. Abkürzungsverzeichnis

ACTA2	Actin alpha 2
Alpha-SMA	Alpha smooth muscle actin
AMI	Akuter Myokardinfarkt in Nativgefäß
ApoE	Apolipoprotein E
CCL11	Eotaxin-1
CreER	Cre Recombinase fusioniert an Östrogen Rezeptor
DAMPs	Damage associated molecular patterns
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure
DsRed	Discosoma red fluorescent protein
ECP	Eosinophil cationic protein
EDNT	Eosinophil neurotoxin
EETs	Eosinophil extracellular traps
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPX	Eosinophil peroxidase
fMLP	N-formyl peptide
FPR2	N-formyl peptide Rezeptor
FXII	Faktor XII
GCaMP5	Green fluorescent protein, calmodulin, M13 peptide
GFP	Green fluorescent protein
GPIIb α	Glycoprotein Iba
HCASMCs	Humane glatte Muskelzellen der Koronararterien
HFD	High fat diet
HMGB1	High mobility group box 1
HSP	Heat shock protein
i.v.	Intravenös
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL-5	Interleukin 5
Klf4	Krüppel like factor 4
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LGALS3	Galectin-3
LysM	Lysozym M
MBP	Major basic protein
MIF	Macrophage migration-inhibitory factor
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Myd88	Myeloid differentiation primary response 88
Myh11	Myosin heavy chain 11
NETs	Neutrophil extracellular traps

NG2	Neuron glia protein 2
Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4
ODN	Oligodeoxynucleotides
oxLDL	Oxidiertes Low-Density-Lipoprotein
PDGFR β	Platelet-derived growth factor receptor beta
PRR	Pattern recognition receptor
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
rtPCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
s.c.	Subkutan
SMCs	Glatte Gefäßmuskellzellen
ST	Stentthrombose
TF	Tissue factor oder auch Gewebefaktor
TLRs	Toll-like receptors
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TVT	Venöse Thrombose
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

5. Literaturverzeichnis

Acharya, K.R., and Ackerman, S.J. (2014). Eosinophil granule proteins: form and function. *The Journal of biological chemistry* 289, 17406-17415.

Avramakis, G., Papadimitraki, E., Papakonstandinou, D., Liakou, K., Zidianakis, M., Dermitzakis, A., Mikhailidis, D.P., and Ganotakis, E.S. (2007). Platelets and white blood cell subpopulations among patients with myocardial infarction and unstable angina. *Platelets* 18, 16-23.

Barlic, J., Zhang, Y., and Murphy, P.M. (2007). Atherogenic lipids induce adhesion of human coronary artery smooth muscle cells to macrophages by up-regulating chemokine CX3CL1 on smooth muscle cells in a TNFalpha-NFkappaB-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 282, 19167-19176.

Bennett, M.R., Sinha, S., and Owens, G.K. (2016). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation research* 118, 692-702.

Bochner, B.S. (2009). Siglec-8 on human eosinophils and mast cells, and Siglec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors. *Clin Exp Allergy* 39, 317-324.

Brandt, M., Schonfelder, T., Schwenk, M., Becker, C., Jackel, S., Reinhardt, C., Stark, K., Massberg, S., Munzel, T., von Bruhl, M.L., *et al.* (2014). Deep vein thrombus formation induced by flow reduction in mice is determined by venous side branches. *Clinical hemorheology and microcirculation* 56, 145-152.

Braun, M., Pietsch, P., Schror, K., Baumann, G., and Felix, S.B. (1999). Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research* 41, 395-401.

Cai, Q., Lanting, L., and Natarajan, R. (2004a). Growth factors induce monocyte binding to vascular smooth muscle cells: implications for monocyte retention in atherosclerosis. *American journal of physiology Cell physiology* 287, C707-714.

Cai, Q., Lanting, L., and Natarajan, R. (2004b). Interaction of monocytes with vascular smooth muscle cells regulates monocyte survival and differentiation through distinct pathways. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 2263-2270.

Chandraratne, S., von Bruehl, M.L., Pagel, J.I., Stark, K., Kleinert, E., Konrad, I., Farschtschi, S., Coletti, R., Gartner, F., Chillo, O., *et al.* (2015). Critical role of platelet glycoprotein Iba1 in arterial remodeling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 35, 589-597.

Chen, G.Y., and Nunez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology* 10, 826-837.

Cherepanova, O.A., Gomez, D., Shankman, L.S., Swiatlowska, P., Williams, J., Sarmiento, O.F., Alencar, G.F., Hess, D.L., Bevard, M.H., Greene, E.S., *et al.* (2016). Activation of the pluripotency factor OCT4 in smooth muscle cells is atheroprotective. *Nature medicine* 22, 657-665.

Chihara, J., Hayashi, N., Kakazu, T., Yamamoto, T., Kurachi, D., and Nakajima, S. (1994). RANTES augments radical oxygen products from eosinophils. *International archives of allergy and immunology* 104 Suppl 1, 52-53.

Combadiere, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117, 1649-1657.

Cronin-Fenton, D.P., Sondergaard, F., Pedersen, L.A., Fryzek, J.P., Cetin, K., Acquavella, J., Baron, J.A., and Sorensen, H.T. (2010). Hospitalisation for venous thromboembolism in cancer patients and the general population: a population-based cohort study in Denmark, 1997-2006. *British journal of cancer* 103, 947-953.

Curtiss, L.K., and Tobias, P.S. (2009). Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 Suppl, S340-345.

Dubucquoi, S., Desreumaux, P., Janin, A., Klein, O., Goldman, M., Tavernier, J., Capron, A., and Capron, M. (1994). Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *The Journal of experimental medicine* 179, 703-708.

Dutta, P., Courties, G., Wei, Y., Leuschner, F., Gorbato, R., Robbins, C.S., Iwamoto, Y., Thompson, B., Carlson, A.L., Heidt, T., *et al.* (2012). Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* 487, 325-329.

Echtler, K., Stark, K., Lorenz, M., Kerstan, S., Walch, A., Jennen, L., Rudelius, M., Seidl, S., Kremmer, E., Emambokus, N.R., *et al.* (2010). Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus. *Nature medicine* 16, 75-82.

Engelmann, B., and Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature reviews Immunology* 13, 34-45.

Fuchs, T.A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D.D., Jr., Wroblewski, S.K., Wakefield, T.W., Hartwig, J.H., and Wagner, D.D. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15880-15885.

Gaertner, F., Ahmad, Z., Rosenberger, G., Fan, S., Nicolai, L., Busch, B., Yavuz, G., Luckner, M., Ishikawa-Ankerhold, H., Hennel, R., *et al.* (2017). Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria. *Cell* 171, 1368-1382 e1323.

Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C.H., Young, S.G., Rollins, B.J., and Charo, I.F. (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *The Journal of clinical investigation* 103, 773-778.

Grako, K.A., and Stallcup, W.B. (1995). Participation of the NG2 proteoglycan in rat aortic smooth muscle cell responses to platelet-derived growth factor. *Experimental cell research* 221, 231-240.

Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., and Rollins, B.J. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molecular cell* 2, 275-281.

Gudbjartsson, D.F., Bjornsdottir, U.S., Halapi, E., Helgadóttir, A., Sulem, P., Jonsdóttir, G.M., Thorleifsson, G., Helgadóttir, H., Steinthorsdóttir, V., Stefansson, H., *et al.* (2009). Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nature genetics* 41, 342-347.

Haley, K.J., Lilly, C.M., Yang, J.H., Feng, Y., Kennedy, S.P., Turi, T.G., Thompson, J.F., Sukhova, G.H., Libby, P., and Lee, R.T. (2000). Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* 102, 2185-2189.

Heit, J.A. (2015). Epidemiology of venous thromboembolism. *Nature reviews Cardiology* 12, 464-474.

Hisada, Y., Ay, C., Auriemma, A.C., Cooley, B.C., and Mackman, N. (2017). Human Pancreatic Tumors Grown in Mice Release Tissue Factor-positive Microvesicles that Increase Venous Clot Size. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*.

Huo, Y., Schober, A., Forlow, S.B., Smith, D.F., Hyman, M.C., Jung, S., Littman, D.R., Weber, C., and Ley, K. (2003). Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nature medicine* 9, 61-67.
Jackson, S.P. (2011). Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nature medicine* 17, 1423-1436.

Jia, G.-Q., Gonzalo, J.-A., Hidalgo, A., Wagner, D., Cybulsky, M., and Gutierrez-Ramos, J.C. (1999). Selective eosinophil transendothelial migration triggered by eotaxin via modulation of Mac-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 interactions. *International Immunology* 11, 1-10.

Jiang, P., Wang, D.Z., Ren, Y.L., Cai, J.P., and Chen, B.X. (2015). Significance of eosinophil accumulation in the thrombus and decrease in peripheral blood in patients with acute coronary syndrome. *Coron Artery Dis* 26, 101-106.

Kameyoshi, Y., Dorschner, A., Mallet, A.I., Christophers, E., and Schroder, J.M. (1992). Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *The Journal of experimental medicine* 176, 587-592.

Kanellakis, P., Agrotis, A., Kyaw, T.S., Koulis, C., Ahrens, I., Mori, S., Takahashi, H.K., Liu, K., Peter, K., Nishibori, M., *et al.* (2011). High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, 313-319.

Kiwamoto, T., Kawasaki, N., Paulson, J.C., and Bochner, B.S. (2012). Siglec-8 as a drugable target to treat eosinophil and mast cell-associated conditions. *Pharmacol Ther* 135, 327-336.

Klatt, C., Kruger, I., Zey, S., Krott, K.J., Spelleken, M., Gowert, N.S., Oberhuber, A., Pfaff, L., Luckstadt, W., Jurk, K., *et al.* (2018). Platelet-RBC interaction mediated by FasL/FasR induces procoagulant activity important for thrombosis. *The Journal of clinical investigation* 128, 3906-3925.

Klouché, M., Rose-John, S., Schmiedt, W., and Bhakdi, S. (2000). Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation* 101, 1799-1805.

Koenen, R.R., von Hundelshausen, P., Nesmelova, I.V., Zerneck, A., Liehn, E.A., Sarabi, A., Kramp, B.K., Piccinini, A.M., Paludan, S.R., Kowalska, M.A., *et al.* (2009). Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Nature medicine* 15, 97-103.

Lerchenberger, M., Uhl, B., Stark, K., Zuchriegel, G., Eckart, A., Miller, M., Pühr-Westerheide, D., Praetner, M., Rehberg, M., Khandoga, A.G., *et al.* (2013). Matrix metalloproteinases modulate amoeboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue. *Blood* 122, 770-780.

Ly, N.P., Komatsuzaki, K., Fraser, I.P., Tseng, A.A., Prodhan, P., Moore, K.J., and Kinane, T.B. (2005). Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14729-14734.

Martinod, K., and Wagner, D.D. (2014). Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* 123, 2768-2776.

Massberg, S., Brand, K., Gruner, S., Page, S., Muller, E., Muller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., *et al.* (2002). A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine* 196, 887-896.

Mietus-Snyder, M., Gowri, M.S., and Pitas, R.E. (2000). Class A scavenger receptor up-regulation in smooth muscle cells by oxidized low density lipoprotein. Enhancement by calcium flux and concurrent cyclooxygenase-2 up-regulation. *The Journal of biological chemistry* 275, 17661-17670.

Moore, K.J., Sheedy, F.J., and Fisher, E.A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature reviews Immunology* 13, 709-721.

Moosbauer, C., Morgenstern, E., Cuvelier, S.L., Manukyan, D., Bidzhekov, K., Albrecht, S., Lohse, P., Patel, K.D., and Engelmann, B. (2007). Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood* 109, 995-1002.

Nakashima, Y., Fujii, H., Sumiyoshi, S., Wight, T.N., and Sueishi, K. (2007). Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 1159-1165.

Napoli, C., D'Armiento, F.P., Mancini, F.P., Postiglione, A., Witztum, J.L., Palumbo, G., and Palinski, W. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *The Journal of clinical investigation* 100, 2680-2690.

Niccoli, G., Ferrante, G., Cosentino, N., Conte, M., Belloni, F., Marino, M., Baca, M., Montone, R.A., Sabato, V., Schiavino, D., *et al.* (2010). Eosinophil cationic protein: A new biomarker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 211, 606-611.

Novotny, J., Chandraratne, S., Weinberger, T., Philippi, V., Stark, K., Ehrlich, A., Pircher, J., Konrad, I., Oberdieck, P., Titova, A., *et al.* (2018). Histological comparison of arterial thrombi in mice and men and the influence of Cl-amidine on thrombus formation. *PloS one* 13, e0190728.

Owens, A.P., 3rd, and Mackman, N. (2011). Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circulation research* 108, 1284-1297.

Ozerdem, U., Grako, K.A., Dahlin-Huppe, K., Monosov, E., and Stallcup, W.B. (2001). NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 222, 218-227.

Pertiwi, K.R., de Boer, O.J., Mackaaij, C., Pabittei, D.R., de Winter, R.J., Li, X., and van der Wal, A.C. (2018). Extracellular traps derived from macrophages, mast cells, eosinophils and neutrophils are generated in a time-dependent manner during atherothrombosis. *The Journal of pathology*.

Pfeiler, S., Stark, K., Massberg, S., and Engelmann, B. (2016). Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica*.

Pfeiler, S., Thakur, M., Grunauer, P., Megens, R.T.A., Joshi, U., Coletti, R., Samara, V., Muller-Stoy, G., Ishikawa-Ankerhold, H., Stark, K., *et al.* (2019). CD36-triggered cell invasion and persistent tissue colonization by tumor microvesicles during metastasis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33, 1860-1872.

Riegger, J., Byrne, R.A., Joner, M., Chandraratne, S., Gershlick, A.H., Ten Berg, J.M., Adriaenssens, T., Guagliumi, G., Godschalk, T.C., Neumann, F.J., *et al.* (2016). Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium. *Eur Heart J* 37, 1538-1549.

Rohrbach, M.S., Wheatley, C.L., Slifman, N.R., and Gleich, G.J. (1990). Activation of platelets by eosinophil granule proteins. *The Journal of experimental medicine* 172, 1271-1274.

Rosenberger, P., Schwab, J.M., Mirakaj, V., Masekowsky, E., Mager, A., Morote-Garcia, J.C., Unertl, K., and Eltzschig, H.K. (2009). Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia. *Nature immunology* 10, 195-202.

Saederup, N., Chan, L., Lira, S.A., and Charo, I.F. (2008). Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in

CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation* 117, 1642-1648.

Schleimer, R.P., Sterbinsky, S.A., Kaiser, J., Bickel, C.A., Klunk, D.A., Tomioka, K., Newman, W., Luscinskas, F.W., Gimbrone, M.A., and McIntyre, B.W. (1992). IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *The Journal of Immunology* 148, 1086-1092.

Seimon, T.A., Nadolski, M.J., Liao, X., Magallon, J., Nguyen, M., Feric, N.T., Koschinsky, M.L., Harkewicz, R., Witztum, J.L., Tsimikas, S., *et al.* (2010). Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* 12, 467-482.

Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology* 7, 311-317.

Shankman, L.S., Gomez, D., Cherepanova, O.A., Salmon, M., Alencar, G.F., Haskins, R.M., Swiatlowska, P., Newman, A.A., Greene, E.S., Straub, A.C., *et al.* (2015). KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature medicine* 21, 628-637.

She, Z.G., Chang, Y., Pang, H.B., Han, W., Chen, H.Z., Smith, J.W., and Stallcup, W.B. (2016). NG2 Proteoglycan Ablation Reduces Foam Cell Formation and Atherogenesis via Decreased Low-Density Lipoprotein Retention by Synthetic Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 36, 49-59.

Shi, C., Jia, T., Mendez-Ferrer, S., Hohl, T.M., Serbina, N.V., Lipuma, L., Leiner, I., Li, M.O., Frenette, P.S., and Pamer, E.G. (2011). Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity* 34, 590-601.

Stark, K., Eckart, A., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., von Bruhl, M.L., Gartner, F., Khandoga, A.G., Legate, K.R., Pless, R., *et al.* (2013). Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nature immunology* 14, 41-51.

Stark, K., Pekayvaz, K., and Massberg, S. (2018a). Role of pericytes in vascular immunosurveillance. *Frontiers in bioscience* 23, 767-781.

Stark, K., Philippi, V., Stockhausen, S., Busse, J., Antonelli, A., Miller, M., Schubert, I., Hoseinpour, P., Chandraratne, S., von Bruhl, M.L., *et al.* (2016). Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice. *Blood* 128, 2435-2449.

Stark, K., Schubert, I., Joshi, U., Kilani, B., Hoseinpour, P., Thakur, M., Grunauer, P., Pfeiler, S., Schmidergall, T., Stockhausen, S., *et al.* (2018b). Distinct Pathogenesis of Pancreatic Cancer Microvesicle-Associated Venous Thrombosis Identifies New Antithrombotic Targets In Vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38, 772-786.

Swirski, F.K., Nahrendorf, M., and Libby, P. (2016). Mechanisms of Myeloid Cell Modulation of Atherosclerosis. *Microbiol Spectr* 4.

Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T.J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., *et al.* (2007). Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation* 117, 185-194.

Terada, N., Ohno, N., Murata, S., Katoh, R., Stallcup, W.B., and Ohno, S. (2006). Immunohistochemical study of NG2 chondroitin sulfate proteoglycan expression in the small and large intestines. *Histochemistry and cell biology* 126, 483-490.

Timp, J.F., Braekkan, S.K., Versteeg, H.H., and Cannegieter, S.C. (2013). Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood* 122, 1712-1723.

Uderhardt, S., Ackermann, J.A., Fillep, T., Hammond, V.J., Willeit, J., Santer, P., Mayr, M., Biburger, M., Miller, M., Zellner, K.R., *et al.* (2017). Enzymatic lipid oxidation by eosinophils propagates coagulation, hemostasis, and thrombotic disease. *J Exp Med* 214, 2121-2138.

van Dijk, R.A., Rijs, K., Wezel, A., Hamming, J.F., Kolodgie, F.D., Virmani, R., Schaapherder, A.F., and Lindeman, J.H. (2016). Systematic evaluation of the cellular innate immune response during the process of human atherosclerosis. *Journal of the American Heart Association* 5, e002860.

van Gils, J.M., Derby, M.C., Fernandes, L.R., Ramkhalawon, B., Ray, T.D., Rayner, K.J., Parathath, S., Distel, E., Feig, J.L., Alvarez-Leite, J.I., *et al.* (2012). The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nature immunology* 13, 136-143.

Venereau, E., Casalgrandi, M., Schiraldi, M., Antoine, D.J., Cattaneo, A., De Marchis, F., Liu, J., Antonelli, A., Preti, A., Raeli, L., *et al.* (2012). Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *The Journal of experimental medicine* 209, 1519-1528.

Venereau, E., Schiraldi, M., Uguccioni, M., and Bianchi, M.E. (2013). HMGB1 and leukocyte migration during trauma and sterile inflammation. *Molecular immunology* 55, 76-82.

von Bruhl, M.L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirniceriu, A., Coletti, R., Kollnberger, M., *et al.* (2012). Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of experimental medicine* 209, 819-835.

Wang, W., Reeves, W.B., and Ramesh, G. (2008). Netrin-1 and kidney injury. I. Netrin-1 protects against ischemia-reperfusion injury of the kidney. *American journal of physiology Renal physiology* 294, F739-747.

Wanschel, A., Seibert, T., Hewing, B., Ramkhalawon, B., Ray, T.D., van Gils, J.M., Rayner, K.J., Feig, J.E., O'Brien, E.R., Fisher, E.A., *et al.* (2013). Neuroimmune guidance cue Semaphorin 3E is expressed in atherosclerotic plaques and regulates macrophage retention. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33, 886-893.

Weber, C., and Noels, H. (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine* 17, 1410-1422.

Xia, G.L., Wang, Y.K., and Huang, Z.Q. (2016). The Correlation of Serum Myeloid-Related Protein-8/14 and Eosinophil Cationic Protein in Patients with Coronary Artery Disease. *BioMed research international* 2016, 4980251.

Yousefi, S., Gold, J.A., Andina, N., Lee, J.J., Kelly, A.M., Kozlowski, E., Schmid, I., Straumann, A., Reichenbach, J., Gleich, G.J., *et al.* (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature medicine* 14, 949-953.

Yousefi, S., Simon, D., and Simon, H.U. (2012). Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. *Current opinion in immunology* 24, 736-739.

Zehrer, A., Pick, R., Salvermoser, M., Boda, A., Miller, M., Stark, K., Weckbach, L.T., Walzog, B., and Begandt, D. (2018). A Fundamental Role of Myh9 for Neutrophil Migration in Innate Immunity. *Journal of immunology* 201, 1748-1764.
Zimmer, S., Grebe, A., and Latz, E. (2015). Danger signaling in atherosclerosis. *Circulation research* 116, 323-340.

Zingg, J.M., Ricciarelli, R., Andorno, E., and Azzi, A. (2002). Novel 5' exon of scavenger receptor CD36 is expressed in cultured human vascular smooth muscle cells and atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22, 412-417.

6. Verzeichnis der Arbeiten der Habilitationsleistung

Marx C, Novotny J, Salbeck D, Zellner K, Nicolai L, Pekayvaz K, Kilani B, Stockhausen S, Bürgener N, Kupka D, Stocker T, Weckbach L, Pircher J, Moser M, Joner M, Desmet W, Adriaenssens T, Neumann FJ, Gerschlick A, ten Berg J, Lorenz M, **Stark K**. (2019) Eosinophil-platelet interactions promote atherosclerosis and stabilize thrombosis by eosinophil extracellular traps. *Blood* 134 (21): 1859-1872.

Stark K, Schubert I, Joshi U, Kilani B, Hoseinpour P, Thakur M, Grunauer P, Pfeiler S, Schmidergall T, Stockhausen S, Baumer M, Chandraratne S, von Bruhl M L, Lorenz M, Coletti R, Reese S, Laitinen I, Wormann S M, Algul H, Bruns C J, Ware J, Mackman N, Engelmann B, Massberg S. (2018) Distinct Pathogenesis of Pancreatic Cancer Microvesicle-Associated Venous Thrombosis Identifies New Antithrombotic Targets In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38(4):772-786.

Stark K, Pekayvaz K, Massberg S. (2018) Role of pericytes in vascular immunosurveillance. *Front Biosci (Landmark Ed)* 23(767-781).

Pfeiler S*, **Stark K***, Massberg S, Engelmann B. (2017) Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica* 102(2):206-213.

**geteilte Erstautorenschaft*

Stark K, Philippi V, Stockhausen S, Busse J, Antonelli A, Miller M, Schubert I, Hoseinpour P, Chandraratne S, von Bruhl M L, Gaertner F, Lorenz M, Agresti A, Coletti R, Antoine D J, Heermann R, Jung K, Reese S, Laitinen I, Schwaiger M, Walch A, Sperandio M, Nawroth P P, Reinhardt C, Jackel S, Bianchi M E, Massberg S. (2016) Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice. *Blood* 128(20):2435-2449.

Stark K, Eckart A, Haidari S, Tirniceriu A, Lorenz M, von Bruhl M L, Gartner F, Khandoga A G, Legate K R, Pless R, Hepper I, Lauber K, Walzog B, Massberg S. (2013) Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol* 14(1):41-51.

von Bruhl M L*, **Stark K***, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Kollnberger M, Byrne R A, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner K T, Wagner D D, Mackman N, Engelmann B, Massberg S. (2012) Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 209(4):819-835.

** geteilte Erstautorenschaft*

7. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meiner Familie für die stetige Unterstützung und die Ermöglichung meines wissenschaftlichen und klinischen Weges.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Massberg und Prof. Schulz für die Möglichkeit zur Habilitation bedanken. Beide haben meinen Werdegang maßgeblich begleitet und geprägt sowie Freude am wissenschaftlichen Arbeiten vermittelt. Ebenso gilt mein Dank Prof. Sperandio für die bereichernde wissenschaftliche Kollaboration und die Begleitung des Habilitationsprozesses.

Weiterhin gilt mein Dank Michael Lorenz für die verlässliche und freundschaftliche Ansprechbarkeit und exzellente methodische Unterstützung.

Für die freundschaftliche Begleitung und den inspirierenden wissenschaftlichen Austausch gilt mein Dank Florian Gärtner und Marie-Luise von Brühl.

Auch möchte ich mich bei an den Forschungsprojekten beteiligten Mitarbeitern bedanken, die meinen Weg wesentlich mitgeprägt haben: Annekathrin Eckart, Sue Chandraratne, Selgai Haidari, Irene Schubert, Meike Miller, Johanna Busse, Charlotte Marx, Sven Stockhausen, Badr Kilani, Kami Pekayvaz, Fitsumbirhan Mehari, Annegret Boda, Niklas Bürgener, Christoph Gold sowie Susanne Sauer, Sebastian Helmer und Nicole Blount.